



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Estudo da implementação de rotinas de controlo
reprodutivo em fêmeas bovinas Holstein Frísia para
optimização de alguns índices reprodutivos numa
exploração leiteira da Ilha Terceira (Açores)**

Telma da Rocha Barcelos

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

2016

Lisboa

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que conseguisse atingir este objectivo de concluir a minha formação em Medicina Veterinária. O gosto pelos animais e por esta profissão apareceu cedo e felizmente tenho conseguido trabalhar com vacas leiteiras ao mesmo tempo que vou acolhendo em casa cães e gatos. Foi-me inculcido pela minha família, o respeito e cuidado pelos animais e desde cedo que eles tem feito parte integrante da minha vida. Muitas são as memórias de fantásticas vacas leiteiras que fizeram parte da exploração leiteira, gatos, cães e cavalos, companheiros de aventuras. Muitas são as aprendizagens que eles têm-me proporcionado e grande é a motivação para saber e fazer mais.

O meu muito obrigado,

Ao meu orientador, Doutor João Nestor Chagas e Silva que me ensinou muito do que sei sobre reprodução bovina e que me orientou na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Pires, que me acompanhou em todas as actividades deste trabalho, por todos os ensinamentos em termos de reprodução bovina, clínica de bovinos e clínica de pequenos animais e pela paciência e incentivo demonstrados.

Ao meu namorado Bruno Costa, que partilha da minha paixão pelos animais, pelo seu apoio incondicional, incentivo e ajuda em todo este processo.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e que me inculcaram esta paixão pelos animais.

Às minhas irmãs que partilharam comigo vários dos momentos inesquecíveis com animais, vacas, vitelas, novilhas, cavalos, cães, gatos, cabritos, ovelhas, coelhos.

Aos meus colegas de curso, David Pereira, Edgar Sousa e Gonçalo Basílio que me apoiaram durante todo curso e que me incentivaram a chegar ao fim.

Aos meus colaboradores, João Nunes e Francisco Brasil, que me ajudaram na execução prática deste trabalho.

Ao Vasco Costa e Beata Bralewska que me ajudaram na análise estatística e tradução para inglês.

Estudo da implementação de rotinas de controlo reprodutivo em fêmeas bovinas Holstein Frísia para optimização de alguns índices reprodutivos numa exploração leiteira da Ilha Terceira (Açores)

RESUMO

Numa exploração leiteira da Ilha Terceira (Açores) introduziu-se na rotina do controlo reprodutivo a utilização do ecógrafo com o objectivo de melhorar alguns índices reprodutivos. Esta introdução permitiu otimizar a avaliação das fêmeas de forma a detectar patologias em tempo útil, resolvê-las e deste modo beneficiar apenas as fêmeas com potencial reprodutivo adequado. Por outro lado, permitiu ainda o diagnóstico precoce de gestação e avaliação da viabilidade embrionária e sobretudo a beneficiação também precoce das fêmeas não gestantes. A ecografia também permitiu eliminar a ideia de que haveria morte embrio-fetal como a principal responsável pelo alongamento do intervalo entre partos registado.

Considerando a necessidade da exploração de melhorar a detecção dos cios e com o objectivo de reduzir o IP e o IPC avaliou-se a utilização de diferentes protocolos de sincronização de cios e ovulação. No Ensaio I, foram inseminadas primíparas e múltiparas. As fêmeas foram divididas em 3 grupos: Grupo Controlo (n=39); Grupo PG, sincronizadas com PGF_{2α} (n=39) e Grupo 2OSy, protocolo do tipo Double-Ovsynch modificado (n=34). Neste ensaio, foi ainda considerado um 4º grupo (Grupo SSy, n=34) com fêmeas ressincronizadas (2ª IA) com um protocolo Select-Synch modificado. A taxa de gestação foi calculada com base no diagnóstico de gestação, realizado através de ecografia aos 28-30 dias após a IA. No Ensaio II foram inseminadas novilhas da raça Holstein Frísia com idade igual ou superior a 14 meses. As fêmeas foram inseminadas 12 horas após os sinais de cio, quer tenham sido observadas em cio espontâneo ou após a administração de um análogo de PGF_{2α}. As novilhas não gestantes foram ressincronizadas com um protocolo de Select-Synch modificado. As novilhas foram inseminadas com sémen sexado (grupo SS) (n=44) e com sémen convencional (n=37). As novilhas inseminadas com SNS foram re-inseminadas com SNS (n=8) e o mesmo sucedendo para as novilhas inseminadas com SS (n=16).

Verificou-se que apesar das taxas de gestação serem em termos médios diferentes entre tratamentos, existia apenas significância ($P < 0,05$) entre o grupo 2OSy e o GC provavelmente por a IA ter ocorrido precocemente relativamente ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Em termos globais e à semelhança de diversos trabalhos, o presente ensaio confirmou as taxas de gestação superiores na utilização do SNS comparativamente com o SS.

Os índices reprodutivos em análise melhoraram relativamente aos registados ao ano anterior ao início do ensaio, apesar de ainda não atingirem os valores desejáveis. Nestas circunstâncias parece impor-se para a exploração em análise, maiores investimentos em programas de detecção de cios que permitam uma maior taxa de submissão à IA quer em novilhas, quer em vacas.

Palavras-chave: ecógrafo, índices reprodutivos, diagnóstico precoce de gestação, ressincronização, protocolos de sincronização, taxas de gestação

Reproductive control measures implementation on the Holstein Frisia cattle as a means of improving the reproduction indexes on the development of a dairy farm at Terceira Island (Azores)

Summary

The dairy branch on Terceira Island (Azores) underwent the controlled reproduction and the use of ultrasonography in order to enhance some of the reproduction indexes.

The introduction of the method allowed to improve the evaluation of the females in terms of detecting pathologies in the early stages, treating them and as a result focusing the attention on the females with the appropriate reproductive potential.

Additionally, the introduction of the method allowed to diagnose the pregnancy very early and evaluate the probability of the embryo to develop and most importantly to act on non-pregnant females. Ultrasonography also eliminated the belief that the embryo-fetal death is the main cause for the intervals between pregnancies to become longer.

Considering the necessity of improving the detection of ovulation and the objective to reduce IP and IPC there was the need to test different protocols of synchronization of mating and ovulation.

In the experiment number 1 there were primiparous and multiparous females inseminated. They were divided into 3 groups: The Control Group (n=39): Group PG, synchronized with PGF_{2α} (n=39) and 2OSy Group, the Double-Ovsynch modified (n=34) protocol. In this experiment there was one more group taken into account – the 4th group (Group SSy, n=34) with 2^a IA females according to the Select-Synch modified protocol. The rate of pregnancies was calculated on the base of the diagnosis that was made with the use of ultrasonography during 28-30 days after IA.

In the experiment number 2 there were 14 months old or older Holstein Frisias inseminated. These females were inseminated 12 hours after observed in estrus, on spontaneous estrus or after the administration of the PGF_{2α} analogue.

The non-pregnant females were subjected to Select-Synch modified protocol. They were inseminated with the semen sex (Group SS) (n=44) and with the conventional semen (n=37). The females inseminated with SNS were re-inseminated with SNS (n=8) and the same happened to the females inseminated with SS (n=16).

It turned out that although the conception rates are on average different in the treatments, there is only significant ($p < 0,05$) difference in between 2OSy and GC groups. Probably because the IA occurred earlier than the pre ovulation follicle. Generally and similarly to other works, this experiment confirmed higher conception rates when using SNS compared to SS.

The reproductive indexes analyzed improved in the year prior to the trial, even though they are lower than desirable. Given the circumstances, it seems important for the analysed cattle farm to invest in earlier ovulation detection that allow higher IA on both heifers and cows.

Keywords: ultrasonography; reproductive index; early diagnosis of conception; repeat synchronization; synchronization protocols; conception rate.

ÍNDICE GERAL

I.	OBJECTIVOS.....	1
II.	RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	2
III.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
	1. Maneio geral, bem-estar e conforto, numa vacaria de leite de alta produção.....	7
	2. Maneio de uma vacaria de leite de alta produção nos Açores, em regime de semi- estabulação.....	10
	3. Principais índices reprodutivos numa vacaria de leite.....	11
	4. Índices reprodutivos nos Açores e estratégias reprodutivas.....	15
	5. Factores que afectam o sucesso da inseminação artificial.....	16
	6. Exame ginecológico em fêmeas bovinas na detecção de problemas do foro reprodutivo.....	22
	7. Factores que influenciam a taxa de gestação nos Açores.....	25
	8. Protocolos de sincronização e ressincronização mais comuns.....	27
	8.1. Protocolos combinados de sincronização do estro.....	29
	9. Diagnóstico de gestação.....	35
	10. Aplicações reprodutivas da ultrassonografia em fêmeas bovinas Holstein Frísia.....	36
	11. Utilização de sémen sexado em novilhas Holstein Frísia.....	47
	11.1. Crias resultantes de SS.....	50
IV.	TRABALHO EXPERIMENTAL	
	1. Introdução.....	52
	2. Material e métodos	
	2.1. Caracterização da exploração.....	55
	2.2. Caracterização do trabalho experimental e dimensão da amostra.....	57
	2.3. Análise estatística.....	59
	3. Resultados e discussão.....	60
V.	CONCLUSÕES	66
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	67
	ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cirurgia de deslocamento de abomaso.....	2
Figura 2. Cirurgia de deslocamento de abomaso.....	3
Figura 3. Cirurgia a hérnia umbilical de vitela.....	3
Figura 4. Diagnóstico de gestação através de ecografia e por palpação transrectal.....	4
Figura 5. Glaucoma traumático em gato e “Cherry eye” em cão	6
Figura 6. Parafimose em cão.....	6
Figura 7. Esquema representativo do protocolo de dupla administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, com 10 a 12 dias de intervalo.....	34
Figura 8. Esquema representativo do protocolo Ovsynch	34
Figura 9. Esquema representativo do protocolo Co-Synch	34
Figura 10. Esquema representativo do protocolo Pré-Synch	34
Figura 11. Esquema representativo do protocolo combinado Co-Synch + CIDR.....	34
Figura 12. Esquema representativo do protocolo Select Synch.....	35
Figura 13. Útero com endometrite, 30 dias após o parto (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	41
Figura 14. Útero com endometrite, 24 dias após o parto (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	41
Figura 15. Ovário com CL 13 dias após o cio (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	42
Figura 16. Ovário com CL cavitário (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	42
Figura 17. Ovário com FL de 1.2cm (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	43
Figura 18. Ovário com FL e CL, fêmea seleccionada para Ovsynch (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	43
Figura 19. Embrião com 28 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	44
Figura 20. Útero com gestação de 45 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)	44
Figura 21. Gémeos com 38 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	45
Figura 22. Feto com 50 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	45
Figura 23. Sexagem fetal, tubérculo genital de fêmea com 65 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	46

Figura 24. Sexagem fetal, tubérculo genital de macho com 65 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro).....	46
Figura 25. Vacas em pastoreio e suplementação com mistura de “unifeed”.....	56
Figura 26. Marcação de caudas após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$	57
Figura 27. Esquema representativo do protocolo com administração de análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Grupo PG).....	58
Figura 28. Esquema representativo do protocolo utilizado no ensaio do tipo Double-Ovsynch modificado (Grupo 2OSy).....	58
Figura 29. Esquema representativo do protocolo Select-Synch, utilizado na ressincronização das fêmeas (Grupo SSy).....	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Casuística das actividades desenvolvidas no estágio em animais de grande porte.....	4
Tabela 2. Casuística das actividades desenvolvidas no estágio em pequenos animais.....	5
Tabela 3. Índices reprodutivos da exploração leiteira, comparação de 2014 e 2015.....	60
Tabela 4. Resultados do Ensaio I, taxas de gestação para vacas submetidas à 1ª inseminação considerando 2 grupos de tratamento, grupo PG e grupo 2OSy e um grupo controlo.....	62
Tabela 5. Resultados do Ensaio I, taxas de gestação em vacas ressincronizadas e re-inseminadas (Grupo SSy).....	62
Tabela 6. Resultados do Ensaio II, taxas de gestação em nulíparas (novilhas) submetidas à 1ª IA, submetidas a um tratamento com PGF _{2α} (Grupo PG) e um grupo controlo.....	63
Tabela 7. Resultados do Ensaio II, taxas de gestação em nulíparas (novilhas) ressincronizadas e re-inseminadas (Grupo SSy).....	63
Tabela 8. Taxas de gestação à 1ª IA, considerando a utilização de 2 tipos de sémen, sémen convencional (SNS) e sémen sexado (SS).....	64
Tabela 9. Taxas de gestação à 2ª IA, considerando a utilização de 2 tipos de sémen, sémen convencional (SNS) e sémen sexado (SS).....	64
Tabela 10. Taxas de gestação obtidas considerando separadamente o sémen utilizado (SNS ou SS) e os protocolos de sincronização adoptados.....	65
Tabela 11. Intervenções realizadas em 145 fêmeas paridas com recurso à ultrassonografia em termos de detecção de problemas no puerpério e resolução dos mesmos.....	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2OSy	Double-Ovsynch
BEN	Balanço energético negativo
BVDV	Vírus da diarreia vírica bovina
Ca	Cálcio
CC	Condição corporal
CE	Cio espontâneo
CIDR	Dispositivo intravaginal de libertação controlada de fármaco (<i>controlled intravaginal drug releasing device</i>)
CL	Corpo lúteo
DA	Deslocamento do abomaso
DG	Diagnóstico de gestação
eCG	Gonadotrofina coriônica equina (<i>equine chorionic gonadotropin</i>)
FD	Folículo dominante
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FL	Folículo
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Gonadoliberina (<i>gonadotropin releasing hormone</i>)
IA	Inseminação Artificial
IAC	Número de inseminações por concepção
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBR	Vírus da rinotraqueíte bovina (herpes vírus)
IP	Intervalo parto
IP-1ªIA	Intervalo entre parto e primeira inseminação
IPB	Balanopostite pustular infecciosa
IPC	Intervalo entre parto e concepção
IPV	Vulvovaginite pustular infecciosa
Kg	Kilograma
LH	Hormona luteinizante
ME	Morte embrionária
MF	Morte fetal
mg	Miligramma (s)
MGA	Melengesterol
MHz	Mega hertz
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
MS	Matéria Seca

NEFA	Ácidos gordos não esterificados
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
P	Fósforo
P4	Progesterona
PAG	Proteínas associadas à gestação
PG	Grupo PG
PGF _{2α}	Prostaglandina F2alpha
PRID	Dispositivo intravaginal de libertação de progesterona (<i>progesterone-releasing intravaginal device</i>)
PVE	Período voluntário de espera
RI	Reflexo de imobilização
RP	Retenção de placenta
SNS	Sémen não sexado (convencional)
Spz	Espermatozóide
SS	Sémen sexado
SSy	Select-Synch
TE	Transferência de embriões
TG	Taxa de gestação
TGF	Sexagem de fêmeas
TGM	Sexagem de machos
THI	Índice de temperatura/humidade

I. OBJECTIVOS

A eficiência reprodutiva é um dos componentes chave para a sustentabilidade de uma exploração leiteira. O objectivo é que cada fêmea em idade reprodutiva tenha um vitelo por ano. Para o atingir, é necessário que estejam reunidos uma série de factores, desde o bem-estar e conforto, a sanidade animal, a ausência de doenças metabólicas e um estado corporal adequado, nutrição e manejo apropriados, uma boa detecção deaios e correcta técnica de IA, sêmen de boa fertilidade, a avaliação ginecológica das fêmeas, entre outros. Paralelamente a estes factores, existem diversas técnicas auxiliares que facilitam a monitorização e concretização dos objectivos reprodutivos, tais como: protocolos de sincronização e ressincronização, aplicação da ultrassonografia na avaliação ginecológica e diagnóstico de gestação.

O objectivo principal deste trabalho foi a optimização de alguns índices reprodutivos de uma exploração leiteira da Ilha Terceira, com implementação de rotinas de controlo reprodutivo. Recorreu-se a ultrassonografia transrectal para a realização do diagnóstico de gestação precoce aos 28 dias após IA e sua reconfirmação aos 70 dias, na avaliação da involução uterina, ciclicidade e por fim, nos diagnósticos associados a doença reprodutiva.

Foram inseminadas vacas e novilhas com recurso a protocolos de sincronização deaios/ovulações e analisou-se a taxa de gestação por ecografia aos 28 dias, com reconfirmação aos 70 dias. As fêmeas não gestantes foram ressincronizadas também com recurso a um protocolo modificado do tipo Select-Synch.

Para além disso, inseminaram-se novilhas com SS e com SNS para comparação das respectivas taxas de gestação.

II. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. Exploração Agro-Pecuária Francisco Helvídio Barcelos (Angra do Heroísmo)

Este estágio teve a duração de 15 meses, de Dezembro de 2014 a Março de 2016.

Durante este período de tempo, tive oportunidade de intervir na rotina desta exploração de bovinos leiteiros, com o médico veterinário Dr. Leandro Pires, implementando uma nova abordagem na área da reprodução da vacaria. Esta abordagem consistiu num acompanhamento das fêmeas paridas, com medições da temperatura rectal nos primeiros 10 dias após o parto, verificação por palpação transrectal e ecografia da involução pós parto, ciclicidade aos 50-65 dias e diagnósticos de gestação aos 28-30 dias, com reconfirmação aos 70 dias.

No âmbito das actividades desenvolvidas destacam-se a inseminação de vacas e novilhas, a resolução de partos distócicos, de patologias reprodutivas (quistos ováricos, metrites, endometrites, piómetras, etc.), o tratamento de mamites, calendarização de protocolos de sincronização deaios/ovulações (CIDR, PG, Select Synch, Ovsynch ou Co-Synch, Double-Ovsynch), acções de sanidade animal (vacinações e desparasitações), a secagem de vacas, análises ao leite, a descorna de vitelos, diagnósticos de gestação através de palpação transrectal e através de ecografia (Figura 4), prolapso uterino e a actividade clínica.

Esta última, no âmbito da clínica geral, foi coordenada pelo Dr. Leandro Pires, e consistiu principalmente em: correcção cirúrgica de deslocamento do abomaso (Figuras 1 e 2), cesariana, terapêutica da retenção placentária, broncopneumonia, indigestão, hipocalcémia, patologia podal (dermatite digital, úlceras, laminite), abscessos cutâneos, hérnias umbilicais (Figura 3), enucleação do globo ocular e tinha em vitelos. Algumas destas actividades foram desenvolvidas noutras explorações da Ilha.



Figura 1. Cirurgia de deslocamento de abomaso



Figura 2. Cirurgia de deslocamento de abomaso



Figura 3. Cirurgia a hérnia umbilical de vitela



Figura 4. Diagnóstico de gestação através de ecografia e por palpação transrectal

Tabela 1. Casuística das actividades desenvolvidas no estágio em animais de grande porte

Área de intervenção	Actividades	Nº de casos
Reprodução e Obstetrícia	IA	272
	Parto distócico	17
	Quistos ováricos	6
	Metrites	14
	Endometrites	12
	Piometra	1
	Protocolos de sincronização de cios/ovulações	176
	Diagnósticos de gestação através de ecografia	544
	Diagnósticos de gestação através de palpação transrectal	560
Clínica	Deslocamento de abomaso	8
	Cesariana	3
	Prolapso uterino	1
	Enucleação do globo ocular	1
	Mamites	25
	Retenção placentária	12
	Broncopneumonia	2
	Indigestão	2

	Hipocalcémia	8
	Patologia podal (dermatite digital)	4
	Patologia podal (úlceras)	2
	Patologia podal (laminite)	3
	Abcessos cutâneos	3
	Hérnia umbilical	1
	Diarreia neonatal	7
	Tinha em vitelos	5
Sanidade	Desparasitações	260
	Vacinações	255
Outros	Secagem de vacas	126
	Recolha de leite para análises	30
	CCS	30
	Descorna	56

2. Clínica Veterinária do Corpo Santo (Angra do Heroísmo)

Este estágio teve a duração de 1 mês e foi realizado com o Dr. Leandro Pires.

Neste período, tive oportunidade de acompanhar a rotina de uma clínica de pequenos animais, acompanhando sobretudo, as consultas e cirurgias. No âmbito desta actividade, tive a oportunidade de desparasitar e vacinar cães e gatos, de efectuar tratamento de glaucomas (Figura 5, a), abcessos e de piodermatites, de auxiliar em cirurgia de deslocamentos da membrana nictitante “cherry eye” (Figura 5, b), em castrações, ovariectomias e parafimose (Figura 6).

Tabela 2. Casuística das actividades desenvolvidas no estágio em pequenos animais

Área de intervenção	Actividades	Nº de casos	Espécie
Clínica	Ovariectomia	1	Canina
	Ovariectomia	8	Felina
	Castrações	1	Canina
	Castrações	4	Felina
	Cherry Eye	2	Canina
	Abcesso podal	1	Canina
	Abcesso cutâneo	1	Felina
	Piodermatite	1	Canina
	Infecção urinária	1	Canina
	Desidratação	1	Felina
	Doença respiratória	1	Felina
	Glaucoma traumático	2	Felina
	Anorexia	1	Felina
	Displasia da anca	1	Canina

Parafimose	1	Canina
Vacinações	10	Felina
Vacinações	8	Canina
Desparasitações	10	Felina
Desparasitações	8	Canina



Figura 5. Glaucoma traumático em gato (a) e “Cherry eye” em cão (b)

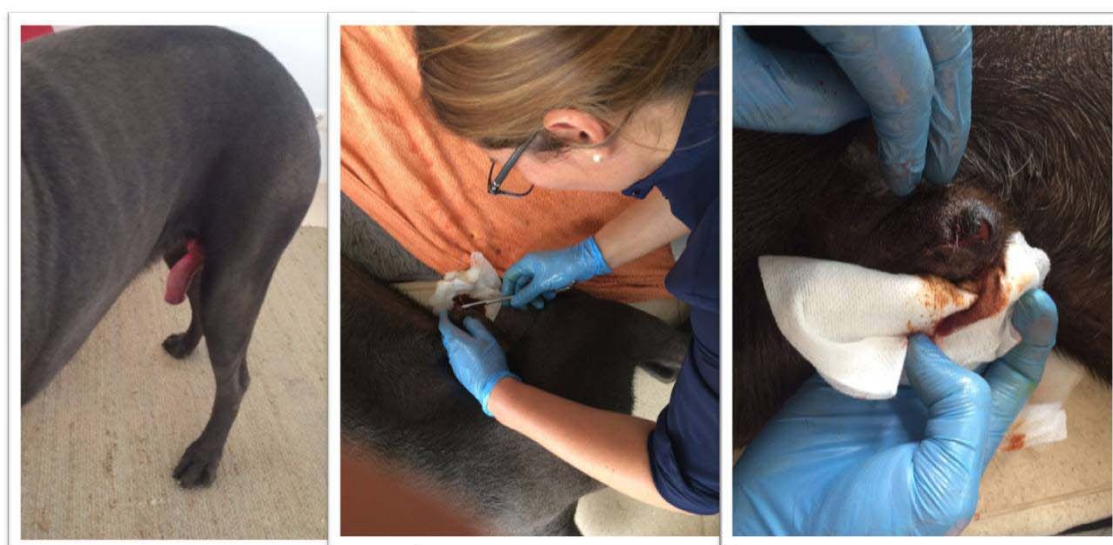


Figura 6. Parafimose em cão

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Maneio geral, bem-estar e conforto numa vacaria de leite de alta produção

A evolução que se tem verificado em termos genéticos e consequentemente, no aumento do rendimento por vaca, obriga ao aperfeiçoamento das medidas de bem-estar e de conforto dos animais de alta produção. O conforto da vaca leiteira tem-se assumido como um dos factores mais importantes para o aumento de produção na última década, sendo que num ambiente deficitário o animal produz menos, come menos, tem maior incidência de mamites, aumenta a contagem de células somáticas, reduz-se a fertilidade, aumentam os problemas podais e, consequentemente, diminui a qualidade e a vida produtiva da fêmea. Associados ao aumento de produção de leite, têm surgido problemas relacionados com mastites (Schreiner & Ruegg, 2003), transtornos podais (Bach *et al.*, 2007) e reprodutivos, resultando num aumento do refugo precoce das vacas (Webster, 2005). A ineficiência reprodutiva neste tipo de explorações leiteiras causa uma grande frustração e, perdas substanciais para os produtores (Call & Stevenson, 1985).

A optimização da eficiência reprodutiva e da produção leiteira envolve pois, um maneio adequado das fêmeas, que também depende da alimentação, do ambiente e dos cuidados gerais com a vaca.

O bem-estar animal pode ser avaliado através da observação do comportamento dos animais, o estado de activação dos seus sistemas fisiológicos e o seu estado geral, sendo factores importantes, o alojamento e as condições das instalações (Veissier *et al.*, 2007).

Estudos recentes indicam que interacções negativas homem-animal poderão influenciar negativamente a produção das vacas leiteiras (Rushen *et al.*, 1999; Breuer *et al.*, 2000). Por outro lado, a manipulação dos animais de uma forma tranquila permite aumentar o seu desempenho reprodutivo e a produção de leite (Cerqueira *et al.*, 2011). Na ordenha, a presença de estranhos, poderá aumentar substancialmente o leite residual, ou seja a vaca esconde o leite, não se deixando ordenhar totalmente, resultando numa redução da produção final de leite nessa ordenha (Rushen *et al.*, 1999).

O tipo de estabulação influencia o comportamento das vacas em descanso. O tempo médio de repouso e a frequência com que cada animal se deita sofrem a influência do tipo de dieta, da hierarquia social, da estrutura do cubículo, do tipo de piso, entre outros factores (Dechamps *et al.*, 1989). O sistema de cubículos, correctamente dimensionado permite que os animais adoptem comportamentos naturais (Cerqueira *et al.*, 2011). No caso de estábulos mal concebidos, a competição

por recursos (alimento, água e áreas de repouso) é um factor de perturbação, resultando em comportamentos agressivos e instabilidade social na exploração (Cerqueira, *et al.*, 2011). Nesse cenário, os animais mais prejudicados são as fêmeas doentes e as primíparas. Por essa razão, é importante separar as primíparas das multíparas, com o objectivo de se obter maior produção de leite e manter um estado corporal adequado, para se reduzirem os problemas relacionados com atraso na concepção. Keyserlingk *et al.* (2008) estudaram o reagrupamento como sendo prática comum no manejo das explorações e concluíram que este tem um efeito negativo no comportamento dos animais e na produção de leite.

A estabulação livre combinada com o exercício regular dos animais no exterior está associada a melhor saúde e bem-estar (Cerqueira *et al.*, 2011). A estabulação e o manejo adequados das fêmeas constituem factores essenciais para a produção de vacas leiteiras (Regula *et al.*, 2004).

A claudicação constitui atualmente um dos problemas de sanidade, da economia e do bem-estar, dos mais importantes das explorações leiteiras (Cerqueira *et al.*, 2011). Causa um impacto negativo na produção e no conforto animal (Thomsen *et al.*, 2008) e contribui também para a diminuição da eficiência reprodutiva, uma vez que estes animais revelam menosaios, tem um maior intervalo entre partos, maior intervalo entre parto e inseminação e maior dificuldade de concepção. A taxa de concepção é inferior nas fêmeas com problemas de claudicação e o aumento da sua prevalência faz elevar a taxa de refugo (Peter *et al.*, 1994). Amory *et al.* (2006) referiram que factores como a dieta equilibrada, a presença de pedilúvio e a realização de tratamentos podais, estavam associados a excelentes performances de locomoção. Fêmeas com problemas de claudicação tendem a reduzir a ingestão de alimento, comprometem a sua condição corporal e reduzem a produção de leite, resultando em perdas económicas para a exploração.

O registo da condição corporal das vacas leiteiras é essencial para se avaliar o balanço energético (Ferguson *et al.*, 1994). Uma condição corporal excessiva é reconhecida como factor de risco para a saúde, com influência no consumo de alimento, no desempenho reprodutivo e na produção de leite. Por outro lado, também a condição corporal baixa tem resultado numa diminuição na produção de leite e numa fraca performance reprodutiva (Domecq *et al.*, 1997).

O grau de higiene da vaca leiteira é um importante indicador de bem-estar (Bowell *et al.*, 2003). A maior sujidade das vacas correlaciona-se positivamente com uma elevada incidência de mamites (Ward *et al.*, 2002) e elevadas contagens de células somáticas (Reneau *et al.*, 2005). As lesões nos tetos, o derrame de leite e a hiperqueratose dos tetos, também estão relacionados com o bem-estar das vacas

leiteiras, no sentido em que estão relacionados com condições específicas da máquina da ordenha, nomeadamente intensidade de vácuo, prática de sobre ordenha, o que compromete o conforto do animal e resulta numa maior incidência de mamites e elevada contagem de células somáticas.

O “stress” hipertérmico é apontado como uma das principais preocupações na produção leiteira e, conseqüentemente, na construção de estábulos. Os prejuízos resultantes da hipertermia ambiental estão relacionados com a diminuição da produção de leite, que pode chegar a uma quebra de 35%. A diminuição dos índices reprodutivos e a falência do estado imunitário dos animais também têm impacto sobre os custos de produção de leite. Além da temperatura, a humidade relativa é também bastante importante para definir a zona de conforto da vaca. Para sermos mais precisos, a zona de conforto térmico depende do estado fisiológico e nível de produção da vaca, sendo que animais de alta produção são mais sensíveis ao “stress” hipertérmico.

O “stress” hipertérmico é definido como sendo o estado a partir do qual os animais não são capazes de dissipar o calor corporal em excesso, de forma a manter a temperatura corporal nos valores normais. Ocorre quando os animais são expostos a condições ambientais de elevada temperatura/humidade. A redução da fertilidade no Verão pode variar entre 20 a 30%, comparativamente aos outros meses do ano (Ribeiro, 2015).

A temperatura e humidade elevadas têm um efeito negativo sobre os padrões comportamentais reprodutivos (diminuição do comportamento de cio, cios mais curtos e nos períodos mais frescos do dia, maior incidência de anestro e de ovulações silenciosas), verifica-se igualmente, um comprometimento das interações endócrinas, alteração do padrão de desenvolvimento folicular, diminuição da qualidade dos oócitos e dos embriões e ainda, um efeito negativo sobre o estado nutricional e balanço energético. A formação dos gametas e o desenvolvimento dos estádios embrionários iniciais são muito sensíveis à temperatura elevada. O “stress” provocado pelo calor pode levar à ovulação de oócitos envelhecidos e de baixa qualidade, resultando em baixos índices de fecundação e à mortalidade embrionária (Ribeiro, 2015).

Por outro lado, fortes chuvadas e vento muito intenso, também têm influência negativa no conforto dos animais. As correntes de ar são extremamente prejudiciais na criação de animais e na produção leiteira, sendo igualmente, uma preocupação a considerar na construção dos estábulos. A pneumonia aguda ou crónica, em vacas no pós-parto ou em animais em criação, pode ser prevenida através de uma ventilação adequada do estábulo e vitaleiro, de um bom manejo geral e de uma alimentação cuidada.

2. Maneio de uma vacaria de leite de alta produção nos Açores, em regime de semi-estabulação

O princípio de um sistema de pastoreio nos Açores é baseado na máxima utilização da pastagem, conjugando o pico mais elevado de necessidades da exploração leiteira com a maior produção de erva na Primavera.

O clima nos Açores apresenta uma sazonalidade medianamente marcada, sendo as 4 estações do ano reconhecidas e típicas de climas temperados. Os Invernos são chuvosos, mas não se apresentam demasiado rigorosos, e os Verões são amenos e mais ensolarados do que o resto do ano. Chove durante todo o ano, apesar de ter menor expressão nos meses de Verão e Primavera. Estas condições meteorológicas permitem, por um lado, ter produção de pastagem ao longo do ano, sendo o pico de maior produção na Primavera e, por outro, que os animais possam pastorear todo o ano.

As vitelas bebem leite até cerca de 2,5 a 3 meses e na maioria das situações a recria é efectuada na pastagem, podendo ou não, ser suplementadas em épocas de carência, com concentrado e silagem.

As novilhas são colocadas à reprodução na pastagem por volta dos 13 a 15 meses e normalmente, são suplementadas no período da cobrição. A adaptação das novilhas à alimentação das vacas leiteiras é efectuada nos últimos 2 meses antes do parto.

O pastoreio dos animais é rotacional permitindo a recuperação da pastagem até nova utilização.

A semi-estabulação é uma estratégia adoptada nos Açores porque permite suplementar as altas produtoras com silagens e concentrados, ao mesmo tempo que utilizam directamente, na dieta, a erva da pastagem. Normalmente, os animais permanecem no estábulo durante os períodos das ordenhas, sendo então suplementados, podendo em alguns casos permanecerem no estábulo durante a noite (Outono, Inverno e Primavera) ou durante o dia (Verão).

As vantagens da utilização da semi-estabulação estão relacionadas com o maneio da pastagem, permitindo um melhor aproveitamento da mesma, nas alturas de excedentes e, menor pisoteio durante as chuvas, uma concentração dos animais junto da sala de ordenha com menor dispêndio de energia e uma alimentação orientada para a alta produção com suplementação por grupo produtivo. Paralelamente, os animais ao permanecerem durante parte do dia na pastagem, reduzem o custo da produção pela alimentação directa de erva, reduzem a incidência de problemas de patas por excesso de permanência no cimento, evidenciam com maior facilidade os sinais de cio e apresentam, de uma forma geral, boas condições de saúde.

A estabulação ou semi-estabulação tem de garantir as melhores condições de higiene para as vacas leiteiras, de forma que a desinfecção das camas, a estrutura e dimensão da mesma, o tipo de piso das camas, a ventilação, o piso do chão sejam aspectos a considerar e de extrema importância, na sua construção. Em termos de manejo é fundamental garantir que os animais têm comida à disposição imediatamente depois da ordenha para permitir que os animais não se deitem até que os esfíncteres dos tetos estejam completamente fechados.

Nos Açores nos regimes de semi-estabulação, a alimentação das vacas leiteiras é à base de pastoreio rotacional, sendo suplementadas com mistura de “unifeed” com feno, silagem de erva, silagem de milho e concentrado. Uma grande parte das explorações não possuem estábulo, nem parque de alimentação e, nesse caso, a alimentação é à base de pastoreio rotacional com suplementação de concentrado na ordenha e silagem, colocada directamente nas pastagens.

As vacas no período seco são separadas da restante manada e alimentam-se em regime de pastoreio. Em alguns casos de semi-estabulação, são suplementadas no período seco com sais aniónicos para prevenção da hipocalcémia e, 15 dias antes do parto, retomam a alimentação das vacas em produção, com incremento progressivo do concentrado.

3. Principais índices reprodutivos numa vacaria de leite

A eficiência reprodutiva é um dos componentes chave para a sustentabilidade de uma exploração leiteira. A máxima eficiência reprodutiva requer o controlo do intervalo entre partos, que importa supervisionar três grandes componentes: (1) o período voluntário de espera, (2) o período de inseminação artificial (IA), que implica a detecção do estro, a 1ª IA, bem como, a beneficiação precoce de vacas não gestantes, e por fim, (3) o período de gestação incluindo o período seco, quando é fundamental garantir a manutenção da gestação e restaurar a condição corporal (Stevenson, 2005).

A fertilidade das vacas leiteiras pode ser influenciada por um conjunto de factores, nomeadamente, o aumento da produção de leite, genética, nutrição, doenças reprodutivas/infecciosas, causas ambientais e práticas de manejo (Veerkamp & Beerda, 2007). Desta forma, importa analisar a performance reprodutiva estabelecendo relações de causa/efeito e aplicando as medidas correctivas adequadas.

A duração do período voluntário de espera (PVE) é uma decisão de manejo que pode variar, na maioria das explorações, entre 40 a 70 dias. Parte deste período de tempo resulta da necessidade fisiológica de involução do trato reprodutivo, após um

parto ou um aborto tardio (Stevenson, 2005). Durante esta fase, a vaca deve adaptar-se ao aumento das necessidades de nutrientes exigidas pela glândula mamária em actividade, e a prioridade no gasto de energia é concentrada na manutenção do estado corporal e crescimento (primíparas) e na produção de leite, em detrimento das necessidades de regulação do ciclo éstrico e início de uma nova gestação (Stevenson, 2005). Quando as vacas não têm problemas no parto, o período de involução uterina pode ser inferior a 40 dias (Kiracofe, 1980). Vários estudos têm vindo a indicar que quanto mais longo for o período voluntário de espera melhor é a taxa de concepção (Britt, 1975). Este período pode implicar a manipulação do ciclo éstrico, com o controlo do crescimento folicular e da regressão lútea, preparando-se a vaca para a inseminação. Um período voluntário de espera de 60 dias é apropriado para a maioria das explorações, contudo as fêmeas dadas como aptas depois de um exame ginecológico aos 30 dias pós-parto, podem ser inseminadas logo aos 45 dias.

Alguns dos índices reprodutivos mais frequentemente analisados, com o objectivo de maximizar a fertilidade de um dado efectivo e que melhor traduzem a situação reprodutiva do mesmo, são: o intervalo entre partos (IP), intervalo entre parto e primeira inseminação (IP-1ªIA), intervalo entre parto e concepção (IPC), idade ao primeiro parto, taxa de concepção (TC), número de inseminações por concepção (IAC) e o índice de refugo (IR).

O intervalo entre partos (IP) corresponde ao intervalo de tempo (expresso em dias) decorrido entre dois partos consecutivos (Parkinson & Noakes, 2001). O objectivo das explorações leiteiras é conseguir um parto por vaca e por ano, sendo o IP médio óptimo de 365 dias (Rodrigues *et al.*, 2012). O IP ou a medida temporal, intimamente com ele relacionada, os dias abertos, são utilizados extensivamente para resumir a performance reprodutiva das explorações leiteiras. As vacas com menos dias abertos ou com intervalos entre partos menores produzem mais leite por dia na sua vida produtiva e produzem mais animais de substituição (Britt, 1975), resultando em maior rentabilidade para a exploração. Embora sejam considerados normais intervalos entre partos mais longos para vacas de alta produção, é geralmente aceite que um intervalo de 13 meses é o objectivo económico ideal (Holmann *et al.*, 1984; Schmidt, 1989). Tendo por base uma gestação de 280 dias nas vacas leiteiras Holstein, o intervalo entre partos de 13 meses corresponde a aproximadamente 115 dias abertos.

Alguns estudos demonstraram que o alongamento do IP para 13 meses traduziu-se num maior retorno económico, comparativamente a intervalos menores (12 meses) (Farin & Slenning 2001). Adicionalmente, um IP inferior ao óptimo produz perdas mais significativas que o prolongar desse mesmo intervalo. Estas constatações levaram a

que se sugerisse como novo objectivo, um IP entre 12,5 a 13,5 meses, embora estes valores, na prática, sejam ainda assim, difíceis de atingir (Farin & Slenning 2001). Por outro lado, este índice tem a desvantagem de serem necessários dois partos consecutivos para o seu cálculo, o que elimina um grupo importante na avaliação do desempenho reprodutivo de uma exploração, as primíparas. Por esse motivo, tem-se utilizado a projecção dos dias abertos que para vacas diagnosticadas como gestantes são os dias do parto até à concepção. Trata-se de uma excelente medida da eficiência reprodutiva, pois os “dias abertos” podem ser calculados logo que a vaca fica gestante, permitindo assim ter-se uma ideia precoce de uma potencial quebra de fertilidade. Um valor elevado de “dias em aberto” pode dever-se a um PVE muito alongado ou a uma má detecção de cios, à elevada produção de leite e consequente balanço energético negativo (BEN), fraca condição corporal, quistos foliculares, vacas repetidoras, técnica inadequada de IA ou utilização inadequada do sémen. Se a 1ª IA ocorrer aos 60 dias pós-parto e a vaca não ficar gestante ainda temos 2 oportunidades para voltar a inseminar e manter um número de dias abertos inferior a 100-110 dias (Ribeiro, 2015).

O intervalo parto – 1ª inseminação (IP-1ªIA) define-se como o número de dias que decorre do parto à primeira inseminação. Este indicador é muito útil pois reflecte a eficiência de detecção de cios e o período de anestro pós-parto, tendo a desvantagem de não englobar nenhum factor de fertilidade (Parkinson & Noakes, 2001). Admitindo como objetivo um IP entre 365-380 dias, o IP-1ªIA deverá variar entre os 65 e os 85 dias.

O intervalo parto – concepção (IPC) corresponde ao número de dias entre o parto e a inseminação fecundante e é um indicador muito usado para avaliação do desempenho reprodutivo (Plaizier *et al.*, 1997; Meadows, 2005). O IP e o IPC são índices que diferem apenas na duração média da gestação da vaca que está incluída no IP. Segundo Keown & Kononoff (2006), considerando um IP entre os 365-380 dias, o IPC deverá ser de 85 dias. Este parâmetro engloba uma avaliação indirecta da fertilidade, já que quantas mais inseminações forem necessárias, mais prolongado será o seu valor. O IPC pode ser um indicador pouco fiável nas explorações com um índice de refugo reprodutivo superior a 15% (Plaizier *et al.*, 1998) ou abate anual global superior a 45% (Meadows, 2005).

Deve ser encontrado um equilíbrio entre o IPC e o IP-1ªIA porque existe a evidência que quanto mais baixo for o IP-1ªIA, mais baixo é o índice de concepção (Reimers *et al.*, 1985; Tenhagen *et al.*, 2004). O IP-1ªIA é pois, afectado pelo período voluntário de espera e pela eficiência da detecção de cios. Um curto período voluntário

de espera está associado a um IP-1ªIA reduzido e, as explorações com boa taxa de detecção de cios revelam IP-1ªIA mais curtos.

A idade ao primeiro parto é importante do ponto de vista económico e reflecte a qualidade da recria implementada na exploração. Determina quando um animal deve começar a sua vida produtiva e, consequentemente, a sua longevidade produtiva. Ettema & Santos (2004) verificaram que animais com menos de 22 meses ao primeiro parto tiveram a primeira lactação comprometida e os componentes do leite e desempenho reprodutivo foram prejudicados, sendo que o maior retorno económico foi obtido em novilhas com 23 a 24,5 meses de idade ao primeiro parto. O objectivo actual implica que as novilhas estejam gestantes aos 15 meses de idade, para que o primeiro parto ocorra aos 24 meses.

O sucesso à 1ª IA (taxa de concepção) é um indicador, expresso em percentagem, que representa o número de vacas que ficaram gestantes com uma IA. O objectivo deste indicador é obter taxas de sucesso de 65 a 70% (Keown & Kononoff, 2006). Porém, alguns autores sugeriram como normal, uma taxa de gestação à 1ª IA de 45%, embora admitissem como possível atingir-se os 60% (Gaines, 1989). O objectivo do produtor é mantê-la, pelo menos nos 50% (Young, 2002), embora o valor mais recomendado seja os 60% (Farin & Slenning, 2001). Esta taxa é fortemente influenciada pela correcta detecção do estro e ovulação, execução da técnica de IA, manejo do sêmen, balanço energético do efectivo e saúde reprodutiva (Parkinson & Noakes, 2001). Segundo Lucy (2001), em vacas saudáveis, 90% das inseminações resultam em fertilização e Dunne *et al.* (2000) referem que 20% dos embriões sofrem mortalidade precoce, antes dos 18 dias de gestação, por altura do reconhecimento materno de gestação. Ainda assim, as taxas de gestação aos 32 dias após IA podem ser superiores a 60%, com uma perda de 15% entre o dia 32 e o dia 74 (Moreira *et al.*, 2001).

O número de inseminações por concepção (IAC) é um bom indicador da fertilidade à inseminação e este índice é calculado dividindo o total de inseminações sobre o total de vacas gestantes. Keown & Kononoff (2006) consideraram que os valores ideais para este índice situavam-se entre 1,5 e 1,7 e referiram que valores mais elevados resultavam de deficiente detecção de cios, o que contribuía para o alongamento do intervalo entre partos. Por seu turno, para Farin & Slenning (2001), os valores para este parâmetro deveriam situar-se entre 1,5 a 2,5 e dependem, entre outros factores, das condições climáticas, das condições de manejo e outras características da exploração.

A percentagem de vacas não gestantes ao diagnóstico de gestação é mais um índice de monitorização da eficácia da detecção de cios. Se existem animais a serem

examinados para diagnóstico de gestação e não estão gestantes, significa que o seu retorno ao cio não foi observado, o que revela uma fraca eficácia na sua detecção (TDC) (Parkinson & Noakes, 2001).

O índice de refugo é muito importante para validar os resultados dos outros índices reprodutivos. Uma exploração ineficiente com uma taxa de refugo global muito elevada (acima de 25%) pode apresentar uma média de dias abertos idêntica a uma exploração eficiente com uma taxa de refugo reduzida. Assim, é fundamental considerar o índice de refugo na análise da eficiência reprodutiva da exploração. A falha reprodutiva é a causa mais comum de refugo das vacas de uma exploração, com uma média de 20% e com uma variação de 0% a 45% das causas de refugo atribuídas a falha reprodutiva (Bascom & Young, 1998). Segundo Keown & Kononoff (2006), o refugo por infertilidade deve ser inferior a 10%.

A substituição de vacas por novilhas representa o futuro da exploração leiteira e pode reflectir uma taxa de refugo anual de 25% a 33% (Stevenson, 2005).

Resumindo alguns dos valores considerados óptimos, de acordo com Parkinson & Noakes (2001), para os índices reprodutivos relativamente a explorações de aptidão leiteira, teremos: IP de 365 dias, IPC de 85 dias, IP-1ªIA de 65 dias, TG 1ªIA de 60%.

4. Índices reprodutivos nos Açores e estratégias reprodutivas

Num estudo desenvolvido por Pavani *et al.* (2015), analisaram-se os resultados da 1ª inseminação de 6 300 vacas, inseminadas entre os 60 e 90 dias após o parto, por um agente local de inseminação artificial “Unicol”, na ilha Terceira, Açores, considerando os dados de inseminações durante o ano de 2012 e assumindo que as fêmeas encontravam-se gestantes se não exibissem cio, 90 dias após a IA.

O número de vacas inseminadas por mês foi semelhante ao longo do ano. Do total de vacas Holstein Frísias inseminadas, 3 300 ficaram gestantes à 1ª IA (55%). Estes resultados foram máximos no Inverno/Primavera ($63,8\% \pm 0,4$) e mínimos no Verão/Outono ($40,2\% \pm 1,5$). Verificou-se uma correlação negativa entre o índice temperatura/humidade (THI) e a taxa de concepção, observando-se nos meses de Julho e Agosto para máximos de THI ($71,1 \pm 2,9$ e $73,8 \pm 2,2$), os mínimos de taxa de concepção (36,8% e 37,5%) (Pavani *et al.*, 2015). No mesmo estudo, demonstrou-se através de um ensaio *in vitro*, que durante os meses quentes, não só a taxa de concepção diminuía, mas também o desenvolvimento embrionário encontrava-se significativamente reduzido. Os oócitos recolhidos durante os períodos mais quentes tiveram menor competência para se desenvolverem em embriões quando comparados com oócitos recolhidos durante períodos frios. Durante os períodos quentes, a maturação nuclear dos oócitos fica bloqueada em estádios precoces da meiose. A

maturação dos que sofreram choque hipertérmico também confirma esta redução da capacidade de maturarem e desenvolverem após fecundação *in vitro* (FIV) (Pavani *et al.*, 2015). O “stress” pelo calor tem um enorme impacto económico nas explorações leiteiras porque, além da diminuição da produção de leite que pode chegar a uma quebra de 35%, regista-se igualmente uma quebra nos índices reprodutivos e uma diminuição do estado imunitário dos animais. A zona de conforto térmico da vaca é entre 5-20°C e, além da temperatura, a humidade relativa é bastante importante para definir a zona de conforto destes animais. Nos Açores, as temperaturas no Verão não são muito altas, mas a humidade chega a atingir valores muito elevados, na ordem dos 77% a 89%, o que resulta num índice temperatura-humidade de 75 (Pavani *et al.*, 2015). De tal forma que nos Açores, mais do que a temperatura, temos de nos preocupar com os efeitos da humidade e sobretudo, da sua conjugação com a temperatura. Um índice temperatura-humidade de 68 unidades é considerado o limite da zona de conforto das vacas leiteiras e o início do “stress” térmico, apesar da taxa de concepção apenas ser afectada com valores superiores a 72 (Pavani *et al.*, 2015).

Dados não publicados, apresentados no 1º Encontro Reprodutivo na ilha Terceira em Dezembro de 2015, realizado pelo Dr. Leandro Pires revelam resultados de alguns índices reprodutivos considerando cerca de 33 explorações da ilha e os dados referentes às IA e partos, ao longo do ano de 2015. Em termos médios, essas explorações têm cerca de 86 vacas, com 2,96 de lactações e uma percentagem de renovação do efectivo de 26%. O número de inseminações por concepção é de 1,75, o IP encontra-se nos 458 dias, o IP-1ª IA é de 103 dias e o IPC é de 148 dias. Estes resultados refletem os melhoramentos que tem vindo a ser feitos nestas explorações pela inclusão de um programa de controlo reprodutivo com exames ginecológicos das fêmeas e diagnósticos de gestação aos 28-30 dias com reconfirmação aos 70 dias após IA. O diagnóstico de gestação aos 30 dias foi um importante avanço nestas explorações leiteiras porque permitiu detectar mais precocemente as fêmeas não gestantes, de forma a serem ressincronizadas para voltarem a ser beneficiadas e, avaliar-se a taxa de mortalidade embrio-fetal e a taxa de animais gestantes à 1ª IA.

A detecção de cios é um dos maiores problemas das explorações leiteiras, e nos Açores não é diferente apesar de os animais se encontrarem livres no campo e, por isso, com maior apetência para expressarem os comportamentos próprios dessa fase do ciclo. Porém, as distâncias, as múltiplas deslocações e a ausência de períodos específicos de observação a cargo dos tratadores levam a que a taxa de detecção de cios seja reduzida resultando num aumento do IAC, aumento dos dias abertos e aumento do IP.

Em termos estratégicos, seria importante incluir programas de sincronização de ovulações para IA a tempo fixo e/ou melhorar os meios auxiliares para detecção dos ciros. Recentemente, um estudo desenvolvido na Nova Zelândia num sistema de pastoreio demonstrou os benefícios económicos na utilização de programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no início da época reprodutiva em vacas cíclicas e em anestro (McDougall, 2010). Paralelamente dever-se-ia manter e expandir às outras explorações, programas de controlo reprodutivo com auxílio da ecografia que permitam um exame ginecológico à fêmea após o parto, mais objectivo, melhor controlo de ciclicidade, a detecção de patologia reprodutiva, diagnóstico de gestação mais precoce, e eventual reconfirmação aos 70 dias e à secagem.

A melhoria da recria das novilhas e consequentemente a diminuição da idade ao 1º parto também devem fazer parte da estratégia reprodutiva a adoptar nos Açores para aumentar a eficiência reprodutiva/produziva e ganho genético. Num trabalho desenvolvido em 2008 e 2009 na ilha Graciosa, por Chagas e Silva (2009), na selecção de novilhas para receptoras de embriões, obteve-se uma rejeição de 48,3% (127/263), essencialmente por deficiente condição corporal, fêmeas em anestro e fêmeas gestantes por CN sem conhecimento do criador. Segundo o autor este cenário sugere um medíocre controlo reprodutivo dos efectivos e necessidade de melhoria da recria.

No que diz respeito à vaca leiteira é fundamental prevenir e limitar o risco de doenças metabólicas puerperais, tais como: hipocalcemia, cetose, deslocamento do abomaso. A hipocalcemia pode ser prevenida com a ingestão de sais aniónicos durante o período de secagem e a sua forma subclínica, através da administração de cálcio, logo após o parto. A cetose que ocorre em consequência da hipoglicémia decorrente do BEN, normalmente em vacas em exagerada condição corporal (> 3,5) ao parto ou subalimentadas no período do pico da lactação, pode ser prevenida através da implementação de uma alimentação equilibrada no último terço da gestação, período seco e pré-parto. O deslocamento do abomaso que está normalmente associado à hipocalcemia, retenção de secundinas ou cetose, é consequência de uma inadequada relação forragem-concentrado no puerpério e pode ser controlado com a introdução progressiva do concentrado no pré-parto e com a manutenção equilibrada da fibra no arraçoamento. Os casos agudos de mamite ocorrem normalmente no início da lactação e os casos crónicos estendem-se ao longo de toda a lactação. É muito importante implementar um adequado protocolo de secagem na exploração, garantir o parto em condições de higiene adequadas, assegurar a manutenção de camas limpas e desinfectadas, uma adequada técnica de

ordena ao nível da desinfecção dos tetos e correcto funcionamento do equipamento de ordenha.

Uma nutrição adequada no período da vaca seca e no pós-parto resulta não só numa maior produção de leite, melhor condição corporal e melhores resultados reprodutivos.

É também fundamental, nos Açores, implementar um programa de erradicação do BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) e do IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina) das explorações. Estas doenças têm uma elevada prevalência no arquipélago e afectam a fertilidade dos animais reprodutores. No que respeita ao BVDV, as principais consequências deste vírus são infertilidade, morte embrionária, abortos e diminuição das defesas dos animais e quanto ao IBR, as vacas reprodutoras podem sofrer aborto, em casos isolados ou sob forma de surto, ocorrendo na maior parte das vezes entre o 6º e o 8º mês de gestação. Neste caso, os principais sintomas são respiratórios (tracto respiratório superior): os animais apresentam febre, corrimento nasal e ocular, salivação, quebra na produção. Este quadro de doença pode agravar-se e evoluir para pneumonia. Este vírus pode também provocar doenças do aparelho genital: Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) nas fêmeas e Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB) nos machos. Em ambos os casos, os animais têm febre, lesões na vulva nas fêmeas e no pénis e prepúcio nos machos.

5. Factores que afectam o sucesso da inseminação artificial

O sucesso de uma inseminação artificial depende de vários factores incluindo a fertilidade do sémen, o maneio e a descongelação da palhinha de sémen, a técnica de inseminação, a destreza do técnico, o período de inseminação, embora a principal limitação para uma fertilização com sucesso seja a precisão da detecção do cio, no sentido de se observar e reconhecer os sinais de estro e identificar correctamente o período do estro, para se definir o intervalo mais provável para a ovulação (Stevenson, 2005). O ponto-chave para se obter o máximo sucesso é inseminar as fêmeas bovinas de forma que a ovulação ocorra quando existe um adequado número de espermatozoides (Spz) viáveis no oviduto. Segundo Stevenson (2005), com um protocolo de observação de cios duas vezes ao dia, as vacas devem ser submetidas à IA, 12 horas após os primeiros sinais de cio. Em média, a vaca é inseminada 12 a 18 horas após o início do cio, aproximadamente 6 a 12 horas antes da ovulação, dando tempo suficiente para o transporte e capacitação dos espermatozoides e permitindo a optimização do período fértil de ambos os gametas. Num estudo de Saacke (2008) verificou-se que inseminar precocemente reduz as taxas óptimas de gestação devido a deficiente acesso de espermatozoides ao óvulo (baixa taxa de fertilização resultante

do pequeno número de espermatozóides viáveis). Por seu turno, a IA tardia reduz as taxas de gestação devido à diminuição da viabilidade do embrião (por envelhecimento do oócito), apesar do acesso dos espermatozóides ao oócito ser normal. Assim, a selecção correcta do período para se efectuar a IA e se atingirem óptimas taxas de gestação, parece resultar de um compromisso entre estes dois intervalos, sendo cedo o suficiente para se maximizar o acesso do sémen ao oócito, mas não tão tarde que este esteja demasiado envelhecido para garantir uma fertilização eficiente (Saacke, 2008).

O sinal mais seguro de cio regista-se quando uma vaca se deixa montar por outra, ficando imobilizada. Cerca de 24 a 36 horas após este comportamento ocorre a ovulação, independentemente da duração do cio (O'Connor, 2007). Yoshida & Nakao (2005) verificaram que apenas 63,4% vacas demonstram o reflexo de imobilização (RI), enquanto as restantes apresentam sinais secundários de cio, ou não apresentam sequer sintomas de cio. Adicionalmente, verificaram que este comportamento apenas se mantém durante um período de $6,6 \pm 6,3$ horas, um valor inferior quando comparado com os registos mais antigos. Os Spz bovinos mantêm-se viáveis no aparelho sexual feminino durante aproximadamente 24 horas e o óvulo é viável no máximo por 12 horas, de forma que é mais provável que seja fertilizado, se o contacto entre ambos ocorrer cerca de 6 horas após a ovulação.

Considerando o investimento em sémen e outros “inputs”, a eficiência reprodutiva deve ser medida com base na taxa de gestação à 1ª IA (Sacke, 2008).

Quando a detecção de estro é o único método para inseminar vacas e não é eficiente, obtêm-se atrasos significativos no intervalo parto - 1ª inseminação e a extensão do intervalo de re-inseminação das fêmeas não gestantes (Bisinotto *et al.*, 2014).

Para se melhorar a eficiência da detecção de cios, é importante garantir a observação das fêmeas, pelo menos em 2 períodos do dia, durante cerca de 30 minutos (manhã e tarde, com um intervalo aproximado de 12 horas), embora se deva optar por incluir métodos auxiliares para a detecção de cio, tais como: podómetros, marcações coloridas da base da cauda, detectores de monta, circuitos-fechados de televisão, touros vasectomizados ou com o pénis desviado, fêmeas androgenizadas, entre outros. Outros factores tais como a qualidade do piso, claudicação, sobrepopulação, lama, chuva, calor, são conhecidos por afectarem negativamente a expressão do estro nas vacas (Allrich, 1994).

A técnica da IA é uma das causas primárias de baixa fertilidade e pode sofrer a influência directa do técnico, do mau maneio do sémen ou da baixa fertilidade do touro (Parkinson & Noakes, 2001). O número de Spz por palhinha, a qualidade do sémen, o

local de deposição do sémen e o período da IA relativamente ao estro, afectam a probabilidade de gestação após IA, quando se compara o sémen sexado com o convencional (Dalton *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004; Saacke, 2008).

A fertilidade dos touros está relacionada com a taxa de capacitação dos seus Spz, a qual é muito variável entre os reprodutores (Blottner *et al.*, 1990).

O local clássico de deposição do sémen é no corpo do útero e os Spz distribuem-se gradualmente por ambos os cornos uterinos e ovidutos. No caso de doses seminais com menor população de Spz, como acontece no sémen sexado, a deposição do sémen pode ser realizada mais perto do oviduto, no corno uterino ipsilateral ao ovário onde vai ocorrer a ovulação, como forma alternativa para se obter melhores taxas de concepção. Por outro lado, a deposição do sémen no cérvix ou vagina resulta em taxas de concepção medíocres (Gordon, 2004).

A correcta descongelação do sémen à temperatura adequada e durante o período recomendado para as doses seminais, é fundamental para se maximizar a sobrevivência e a mobilidade dos Spz pós-descongelação (Costa *et al.*, 2011). O processo de descongelação em água a 35-37°C é o recomendado para se obterem os melhores resultados de fertilidade. É também fundamental que o tempo entre a descongelação do sémen e a IA não exceda os 10 minutos para SNS e os 5 minutos para SS (Costa *et al.*, 2011). O local de deposição, o maneo adequado na descongelação e no período até o sémen ser depositado no tracto genital feminino dependem do técnico e da sua experiência. A adequada manipulação do sémen descongelado tem como objectivo conservar a fertilidade dos Spz até à sua deposição na vaca, o que só se consegue minimizando a sua exposição a condições adversas que possam comprometer a sua viabilidade. A baixa temperatura do azoto líquido (-196°C) para o processo biológico dos Spz, permitindo o seu armazenamento por tempo indefinido. A temperatura crítica é de -80°C e a exposição do sémen a temperaturas mais elevadas conduz a alterações irreversíveis que não podem ser corrigidas pela sua reimersão no azoto líquido. Por essa razão, é fundamental manter o contentor de azoto líquido onde o sémen está armazenado, convenientemente abastecido e garantir que o sémen é devidamente manuseado no momento de ser retirado para transferência ou IA.

Para se retirar uma dose de sémen, os “canisters” devem ser elevados até à linha gelada do colo do contentor, por um período inferior a 5 segundos. Depois de descongelada deve garantir-se que não existe choque térmico, aquecendo previamente o “pistolet” e mantendo-o assim até se chegar perto da vaca. Quando após a descongelação de uma palhinha, a submetemos a temperaturas ambientais baixas antes da IA, ocorrem danos irreversíveis nos espermatozóides resultando em

perda da mobilidade, da actividade metabólica e do seu potencial fecundante, devido à destruição das suas membranas plasmáticas (Ribeiro, 2015).

O manejo da exploração tem grande influência no sucesso da IA e inclui todos os factores que afectam o bem-estar e provocam “stress” nos animais. Podem resultar de factores individuais, nomeadamente o manejo dos tratadores, ou podem ser de origem ambiental e estrutural, como excesso de calor/humidade, ventos ou fortes chuvadas, alterações bruscas da alimentação e/ou de parques e, por fim, podem estar relacionados com debilidades físicas ou doenças. Segundo Wolfenson *et al.* (2000), uma das principais causas de quebra de fertilidade da IA pode ser o “stress” hipertérmico no Verão, podendo levar a um decréscimo de 40 a 60%, relativamente à TG normal. Segundo os mesmos autores, este tipo de “stress” altera o desenvolvimento folicular e reduz a produção de hormonas esteróides. Estas perturbações influenciam a competência dos oócitos, diminuem a expressão do estro e aumentam a percentagem de cios não detectados.

É também importante que exista nas explorações um plano de vacinação adequado. As principais doenças infecciosas que podem afectar a eficiência reprodutiva são a campilobacteriose, rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e diarreia viral bovina (BVD). Para além da vacinação, é necessário implementar boas práticas de higiene e de desinfeção das instalações, para se diminuírem os riscos de infecções.

A nutrição desempenha um papel importantíssimo no desempenho reprodutivo dos bovinos leiteiros. A alimentação da vaca leiteira é o parâmetro mais crítico de uma exploração, já que só um rigoroso manejo da alimentação permite obter a máxima produção sem a ocorrência de doenças. Os períodos de maior relevância são o período seco e os períodos de transição. Partindo de uma dieta adequada nestes períodos, o balanço energético negativo é uma consequência fisiológica do peri-parto, sendo rapidamente resolvido na maior parte das vacas (Grummer, 2007). Um menor período de BEN, através do aumento da energia na dieta, reduz o número de dias até à primeira ovulação e melhora a taxa de concepção (Santos, 2008). Relativamente à proteína, quando em excesso, particularmente em animais com BEN, pode reduzir a taxa de concepção (Roche, 2006). Um BEN acentuado está associado a um atraso no retorno à ciclicidade no pós-parto (Peter *et al.*, 2009) e à inferior qualidade do embrião (Santos *et al.*, 2009). Os mesmos autores demonstraram que a alteração da condição corporal no pós-parto, associada a um BEN, conduzia ao aumento do intervalo IP-1ªIA, a uma menor taxa de gestação e a uma maior percentagem de perdas do concepto.

Há pois, uma forte evidência que o maneio alimentar correcto no pré-parto é essencial para a saúde uterina. A alimentação/suplementação da vaca leiteira deve garantir que as fêmeas atinjam uma condição corporal entre 2,5-3,5 (numa escala de 1-5) na altura do parto e não devem perder essa condição corporal, até à altura da concepção (Ball & Peters, 2004).

6. Exame ginecológico em fêmeas bovinas na detecção de problemas do foro reprodutivo

O exame ginecológico em fêmeas bovinas é efectuado normalmente através de palpação transrectal e/ou ultrassonografia para definição do estado fisiológico, diagnóstico de doença reprodutiva, apesar de existirem outras técnicas para avaliação do estado reprodutivo como a vaginoscopia, testes baseados nos níveis de progesterona, cultura e biópsia uterina, recolha de embriões e testes citogenéticos (Farin & Slenning 2001). O exame individual da fêmea deve incluir a história reprodutiva, exame físico completo e exames adicionais caso seja necessário, como por exemplo, análise de sangue, urina, leite. No exame físico, é fundamental considerar o estado corporal do animal, de forma a avaliar-se o equilíbrio da dieta e o balanço energético do animal.

O exame ginecológico de novilhas tem como objectivo garantir a adequada formação do aparelho reprodutivo feminino e detectar qualquer anomalia ou patologia, com o intuito de as inseminar na idade reprodutiva aconselhável (13 a 15 meses com peso de aproximadamente 350Kg).

Nas primíparas e múltiparas, a importância do exame ginecológico passa por identificar o estado fisiológico, identificar as vacas em peri-estro, diagnosticar quistos ováricos, piómetras, maceração e mumificação fetal, avaliar a involução do útero pós-parto com o intuito de identificar e resolver qualquer problema que possa resultar em atraso no retorno à ciclicidade e atraso na inseminação e/ou aumento dos dias em aberto. Também fazem parte do exame ginecológico, o diagnóstico de gestação precoce, a reconfirmação da gestação e o acompanhamento na secagem, de modo a detectarem-se as mortes embrionárias ou fetais, abortos, gestação gemelar, etc.

A monitorização do útero e dos ovários no período pós-parto é importante porque um atraso da involução uterina, infecção uterina ou patologia ovárica, causam subfertilidade e consequente perda económica para as explorações.

Retenções placentárias, endometrite, ovário quístico, podem atrasar a concepção em 25, 31 e 64 dias, respectivamente, em comparação com vacas com período pós-parto normal (Borsberry & Dobson, 1989). Os eventos que compreendem o período

pós-parto incluem involução uterina, regeneração do endométrio, eliminação da contaminação bacteriana do útero e retorno da actividade cíclica dos ovários.

O exame ginecológico deve ser realizado com regularidade, principalmente nos animais que apresentarem distócias, retenção de placenta, descarga purulenta fétida ou purulenta após 15 dias do parto, ausência de cio 50 dias pós-parto, retorno ao cio após três inseminações, aborto em qualquer momento da gestação, comportamento anormal de cio, intervalo anormal entre cios.

A involução uterina demora cerca de 3 semanas e a regeneração completa do endométrio anda por volta dos 40-50 dias. As retenções de placenta predispoem o útero a infecções que atrasam a involução e o retorno à actividade ovárica. A placenta é normalmente expelida entre 6 a 8 horas após o parto e considera-se que existe retenção quando a expulsão da placenta não ocorre até às 24 horas. A remoção manual da placenta está contra-indicada sendo unanimemente aceite esperar cerca de 7 dias até que a placenta se destaque naturalmente para evitar o traumatismo do endométrio. Nestes casos, deve-se, depois do tratamento inicial, monitorizar a vaca 15 a 30 dias pós-parto para despiste ou tratamento de metrite ou endometrite (Ribeiro, 2015).

As infecções uterinas de origem bacteriana prejudicam a função uterina, a função ovárica e os centros superiores de controlo hipotalâmico-hipofisário. Clinicamente, as infecções uterinas dividem-se em metrite puerperal, que ocorre até aos 15 dias pós-parto (corrimento vaginal abundante e fétido, útero hiperplásico, comprometimento geral do organismo) devido a partos distócicos, com poucos cuidados de higiene, nado-mortos, partos gemelares, retenção placentária e endometrite clínica/subclínica e, crónica por volta do 21º dia pós-parto (corrimento vaginal esporádico, com ausência de outros sintomas clínicos) (Ribeiro, 2015). Na endometrite, as vacas apresentam um útero aumentado e um corrimento purulento ou mucopurulento, após os 21 dias de lactação. A maioria das endometrites clínicas é eliminada naturalmente pelo organismo durante o período voluntário de espera, desde que as vacas tenham uma alimentação equilibrada e um bom estado corporal. Nas endometrites subclínicas (crónicas) verifica-se a ausência de corrimento vaginal purulento, embora se possa registar a inflamação do endométrio através de citologia ou, em alternativa, o diagnóstico ser resultado do exame clínico através da observação do muco cervical com um espéculo ou um vaginoscópio. Estima-se que em vacas com endometrite subclínica, a taxa de fecundação seja cerca de 20% inferior ao normal e o intervalo entre partos mais longo, resultando em 3 a 5% de animais refugados por infertilidade (Ribeiro, 2015). Os tratamentos seleccionados para o tratamento da endometrite subclínica são normalmente a combinação de uma PGF2 α com um antibiótico

intrauterino efectuado quando existe um CL funcional (Ribeiro, 2015). A piómetra é uma forma específica de endometrite crónica, com presença de um CL persistente. A libertação de PGF2 α pelo endométrio não é suficiente para induzir a luteólise, de forma que é necessário a administração única de PGF2 α exógena ou dupla, com intervalo de 12 a 14 dias, para se conseguir a regressão do CL, maturação de um folículo, contracção do miométrio, relaxamento do cérvix e expulsão do material purulento (Ribeiro, 2015).

O anestro é uma situação em que os ovários se encontram inactivos e pode ser detectado por exame ecográfico do tracto reprodutivo ou por palpação transrectal por técnico experiente. Os ovários são então, pequenos, sem presença de CL ou folículos de tamanho ovulatório (Ribeiro, 2015). O tratamento farmacológico do anestro está sempre pendente da revisão do plano alimentar, da condição corporal da vaca, do nível de produção e de doenças associadas. Em efectivos leiteiros com manejo eficiente, o anestro é inferior a 10% nos primeiros 40 dias pós-parto (Ribeiro, 2015).

Os quistos ováricos são estruturas foliculares anovulatórias de diâmetro superior a 25 mm, que persistem por mais de 10 dias na ausência de um CL funcional e podem ser acompanhados de comportamento éstrico anormal (intervalos éstricos irregulares, ninfomania, anestro). Estão relacionados com os variados problemas metabólicos da vaca leiteira no início da lactação, perda de condição corporal, “stress”, BEN e desenvolvem-se devido a uma ausência do pico de LH em resposta ao aumento pré-ovulatório de estradiol. Podem ser classificados como luteínicos ou foliculares, dependendo do grau de luteinização das suas paredes. Os luteínicos estão associados ao anestro, possuem uma parede mais espessa e o seu diagnóstico está dependente da mensuração da concentração plasmática de progesterona ou do recurso à ecografia (Ribeiro, 2015).

A detecção de morte embrionária é normalmente avaliada através de ecografia entre os 28 e 42 dias após a inseminação. A fase de desenvolvimento embrionário vai da fecundação até ao 45º dia de gestação, seguindo-se o desenvolvimento fetal até ao parto. A morte embrionária é considerada uma das principais razões de infertilidade em vacas leiteiras e pode ser precoce não afectando a duração do ciclo éstrico ou tardia, quando ocorre após o período do reconhecimento materno da gestação e o CL regride mais tardiamente, prolongando o ciclo éstrico. Os principais factores etiológicos da mortalidade embrionária estão relacionados com a fertilidade inerente à fêmea e ao reprodutor, à idade da vaca, a problemas de endometrite, a danos causados ao embrião durante a palpação uterina, a agentes infecciosos, “stress”, IA fora de tempo e à insuficiente função luteínica do CL (Ribeiro, 2015).

É igualmente importante fazer um exame ginecológico a todas as vacas que não ficam gestantes ao fim de três IA consecutivas. Estas vacas são designadas de repetidoras, porque apesar de ciclarem normalmente não ficam gestantes, normalmente devido a atrasos na ovulação, endometrites subclínicas, patologias no oviducto, alterações patológicas do endométrio, má detecção dos cios, etc.

O aborto ocorre depois do 45º dia de gestação e é considerada normal, uma taxa anual, de 5% de abortos. Em casos de abortos numa taxa superior a 10%, a situação não é considerada normal e é necessário verificar as causas, que podem ser de origem infecciosas ou não infecciosas (Ribeiro, 2015).

A gestação gemelar é identificada precocemente através de ecografia e permite proporcionar, em tempo oportuno, um manejo adequado à essa fêmea. Os partos gemelares não são desejáveis em efectivos de leite porque estão associados a uma maior mortalidade neonatal, partos distócicos, retenção de placenta, free-martinismo, excessiva perda de condição corporal e de leite.

7. Factores que influenciam a taxa de concepção nos Açores

Vários factores são considerados críticos na obtenção de boas taxas de concepção: qualidade do sémen, período da inseminação, competência do inseminador no manejo do sémen e na sua deposição no tracto reprodutivo, adequada detecção do cio, saúde e nutrição dos animais. Na maioria das estratégias reprodutivas, quer incluam a sincronização de ovulações ou não, a qualidade do sémen, a sua deposição e a oportunidade da IA, são momentos críticos para o sucesso de uma gestação (Saacke, 2008).

Na ilha Terceira, existem vários centros de armazenagem de sémen bovino públicos e privados. Isto significa que por um lado existem explorações que tem armazenamento próprio do sémen e que inseminam directamente as suas vacas, e outras explorações que recorrem a prestação de serviços nesta área. Em qualquer dos casos, a IA requer rigor e perícia por parte do técnico exterior à exploração ou do próprio criador.

A adequada manipulação do sémen congelado tem o objectivo da conservação da fertilidade dos espermatozóides até à sua deposição no útero da vaca. A ocorrência de choques térmicos por manipulação desadequada, armazenamento do sémen a temperaturas acima de -80°C, mau manejo do contentor do sémen, exposição do sémen congelado a temperaturas elevadas, conduz a alterações irreversíveis dos Spz (Ribeiro, 2015).

Comparando a actividade de um centro de IA público e os particulares, podemos considerar que por um lado, os inseminadores públicos terão maior experiência

resultante do maior número de vacas inseminadas, mas por outro, os inseminadores particulares tem maior vantagem na oportunidade da IA. No caso dos inseminadores públicos, muitas vezes, uma vaca vista em cio de manhã é inseminada logo ao início da tarde, quando idealmente, deveria ser inseminada, 12-16 horas após os primeiros sinais de cio.

Quando ocorre um atraso no desenvolvimento do embrião, a produção do Interferon-T (proteína específica da gestação) é insuficiente, o que impossibilita a inibição da luteólise (Ribeiro, 2015).

O Governo Regional dos Açores disponibilizou azoto líquido para todos os centros de armazenagem de sémen bovino do arquipélago, de forma que estão criadas todas as condições para um perfeito armazenamento do material seminal. Porém tem de existir algum cuidado no transporte do sémen até ao local da IA. Muitas vacas e novilhas são inseminadas nos pastos, em mangas ou nas ordenhas móveis, longe das explorações e isto implica o transporte do contentor com o sémen. O termos de descongelação é mantido com a água a 35-37°C pela ligação ao isqueiro do carro, caso contrário este poderia ser mais um motivo para a depreciação da qualidade seminal.

Considerando que toda a técnica de armazenamento do sémen, descongelação da palhinha de sémen, técnica de IA, deposição do sémen à entrada do corpo do útero e período mais adequado para a IA, são executadas com precisão e rigor, a detecção do cio e o estado de saúde e nutrição dos animais passam a ter especial relevância.

A detecção do cio nos Açores encontra-se facilitada, no sentido em que as fêmeas em pastagem mais facilmente demonstram o comportamento de cio, embora se verifique alguma dificuldade por parte dos criadores de permanecer nos diferentes terrenos o tempo suficiente para o seu eficiente registo. A saúde e nutrição dos animais têm enorme relevância, tanto nas novilhas, como nas vacas.

Tem-se verificado melhorias significativas na recria das vitelas e novilhas, nomeadamente conseguindo-se um maior peso corporal à primeira beneficiação aos 13-15 meses de idade, apesar de ainda existirem várias explorações que apenas alimentam as novilhas nas pastagens mais altas e de pior qualidade, resultando num atraso à 1ª IA, de cerca de 6 meses.

Actualmente, regista-se um melhor conhecimento das necessidades da vaca leiteira no período seco e consequentemente no pós-parto. No período seco, as vacas em pastagem são suplementadas com sais aniónicos de forma a prevenir a hipocalcémia no momento do parto. A transição do arraçoamento é um ponto crítico e deve ser feito de forma progressiva principalmente antes do parto. Desta forma, reduzem-se os problemas durante o parto e no pós-parto, prevenindo-se os

consequentes problemas reprodutivos e quebras de produção resultantes de doenças metabólicas e puerperais: cetose, acidose, deslocamentos de abomasos, hipocalcémia e mamite. A manutenção de uma condição corporal adequada, com um BEN não crítico e a prevenção e tratamento atempados de infecções, cria as condições ideais para que a fêmea tenha bons resultados reprodutivos.

Como foi referido em capítulo anterior, é também importante erradicar o BVDV e IBR das explorações, para a melhoria da taxa de concepção nos Açores.

8. Protocolos de sincronização e ressincronização mais comuns

A detecção do estro constitui a maior limitação para se conseguir uma gestação (Barr, 1975). A sincronização do ciclo éstrico tem desempenhado, nas fêmeas bovinas, um importante papel no controlo da reprodução, nestes últimos anos.

Os programas de sincronização têm permitindo a utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e o desenvolvimento da transferência de embriões (TE) em bovinos; têm facilitado a IA por grupos, permitindo a manipulação do intervalo entre partos em fêmeas cíclicas e anéstricas. As principais vantagens destes programas estão relacionadas com a possibilidade de manipular o período voluntário de espera, de serem eficientes em fêmeas em anestro e em fêmeas em quem não se observa o estro, apesar de ovularem, e ainda, por facilitarem o maneio da exploração, agrupando os partos por lotes e épocas de parição.

Os melhores protocolos de sincronização dependem de cada exploração e do respectivo maneio, sendo que o ideal é serem simples e eficientes, com um mínimo de intervenções nas fêmeas (Stevenson, 2005). É importante comparar os resultados dos diferentes programas em termos de taxas de concepção, mas sempre que os resultados são similares, a IATF assume a vantagem pelo facto de todos os animais serem submetidos à IA e por não ser necessária a detecção do estro (Stevenson, 2005).

Vários estudos têm comprovado os benefícios da utilização da IATF em explorações de alta produção e em produções de leite à base de pastagem, pela capacidade de aumentar a taxa de vacas inseminadas (taxa de submissão) (Bisinotto *et al.*, 2014).

A sincronização da ovulação é normalmente feita com recurso a progestagéneos, prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ou seus análogos de síntese, ou ainda, pela combinação de progestagéneos e da $PGF_{2\alpha}$ ou de progestagéneos com estrogénios.

A $PGF_{2\alpha}$ e os análogos (e.g. Dinolytic, Enzaprost, Dalmazin, etc.) são administrados por via intramuscular e têm como função induzir a regressão funcional e morfológica do corpo lúteo maduro, diminuindo a secreção de progesterona (P4) e

promovendo a transição para a fase folicular, resultando num aumento da frequência pulsátil da hormona luteinizante (LH), de forma a permitir que a ovulação possa ocorrer (Gordon, 1994).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ deve ser administrada a fêmeas com um corpo lúteo funcional, estrutura ovárica que está presente entre os dias 5 e 15 do ciclo éstrico. Em fêmeas com corpo lúteo funcional (CL) e folículo dominante (FD) no momento da administração, o estro ocorre em 36 a 48 horas, enquanto se a mesma intervenção ocorrer em presença de um folículo na fase de pré-dominância, o cio levará 3 a 5 dias a manifestar-se. Segundo Pereira (2013), as fêmeas que ovulam espontaneamente após a regressão lútea induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$, apresentam um folículo pré-ovulatório de dimensões superiores aos das vacas submetidas a protocolos de sincronização de ovulação.

Um dos protocolos clássicos utilizado comumente é o da administração de duas injeções de $\text{PGF}_{2\alpha}$, com um intervalo de 14 dias (vacas) ou com um intervalo de 10 a 12 dias (novilhas). As fêmeas são inseminadas após a segunda administração. Este intervalo tem por base um lapso de tempo necessário para que exista um CL maduro, sensível à segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Beal, 1998).

Uma dupla injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com um intervalo de 10 a 12 dias (Figura 7), em animais cíclicos, permite a detecção do estro em 80 a 90% das fêmeas tratadas. Neste protocolo, cerca de 60% das fêmeas demonstram estro 48 a 72 horas após a última administração de prostaglandina, e as restantes 20% entre 72 a 96 horas (Sreenan & Diskin, 1992; Diskin & Sreenan, 1993). A IATF às 72 horas após a segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ resulta normalmente, em taxas de concepção inferiores às obtidas por inseminação após observação do estro (Stevenson, 2005).

A sincronização de cios com recurso a compostos progestagénicos, resulta do facto dessas substâncias simularem a presença de um corpo lúteo funcional em qualquer das fases éstricas, por libertação contínua de P4. Existem várias formas de administração de progesterona ou progestagénicos, desde formas orais, injectáveis (via intramuscular), dispositivos intravaginais ou de implantes auriculares subcutâneos. Os mais utilizados são os dispositivos intravaginais como o PRID (progesterone releasing intravaginal device, 1,55g) ou o CIDR (controlled internal drug release, 1,38g) (Lane *et al.*, 2008).

Com vacas leiteiras, a taxa de sucesso dos métodos à base de progestagénicos varia entre 50 e 70% e depende do momento pós-parto em que se inicia o tratamento, da condição corporal da fêmea e se ela está ou não em anestro (Ribeiro, 2015). Anteriormente utilizou-se o estradiol em conjunto com a progesterona com o objectivo de provocar atresia do folículo dominante e induzir a emergência de uma nova onda

folicular. Esta associação tinha a vantagem de induzir a ciclicidade em vacas anéstricas. Depois da proibição da utilização do estradiol pela UE passou a recorrer-se apenas aos progestagénios ou a combinar os mesmos com a hormona hipotalâmica ou gonadoliberina (GnRH).

A GnRH (e.g. Acegon, Receptal, Dalmarelin, etc.) tem a função de regular a libertação das hormonas adeno-hipofisárias. Esta hormona de natureza peptídica influencia directamente o ciclo éstrico das fêmeas induzindo a secreção da FSH (hormona folículo-estimulante) e da LH (Thibault e Levasser, 1991). A administração da GnRH ou dos seus análogos, leva ao aparecimento de uma nova onda de crescimento folicular, 2 a 3 dias após o tratamento (Lamb *et al.*, 2010), mas não implica que haja sempre ovulação, porque a capacidade de um folículo ovular depende do seu estágio de desenvolvimento no momento (Gordon, 1994). O pico de LH induzido pela GnRH é responsável pela ovulação do folículo dominante quando administrada na fase de dominância da onda folicular. Não ocorrendo a ovulação, o folículo entra em regressão, surgindo uma nova onda de crescimento folicular 2 a 3 dias depois (Pursley *et al.*, 1995).

Uma administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes da GnRH permite pré-sincronizar a maioria das fêmeas, na fase inicial do ciclo éstrico.

A GnRH deve ser administrada sete dias antes da segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, promovendo como já se referiu, uma nova onda de crescimento folicular, 1 a 2 dias depois. Deste novo grupo de folículos, emerge um novo folículo dominante, que amadurece e ovula, após a indução do estro, por via do agente luteolítico (Pursley *et al.*, 1995). Com este protocolo, as fêmeas podem ser inseminadas após detecção do estro, ou em tempo fixo, 72 a 80 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A sincronização da ovulação também pode resultar da combinação dos tratamentos anteriores, podendo obter-se uma melhoria da taxa de fertilidade.

8.1. Protocolos combinados de sincronização do estro

O programa Ovsynch foi originalmente desenhado para melhorar a taxa de submissão à IA, devido aos desafios da detecção de estro nas explorações leiteiras (Pursley *et al.*, 1997). No entanto, conhecimentos recentes da fisiologia reprodutiva da vaca leiteira e a possibilidade de se manipular o crescimento folicular e a vida útil do corpo lúteo, criaram oportunidades para otimizar a fertilidade ao mesmo tempo que era assegurada a IA (Moreira *et al.*, 2001). O protocolo Ovsynch (Figura 8) consiste na sincronização da onda folicular e utiliza GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$, com o objectivo de estimular e induzir a ovulação. O momento do cio, após a indução da luteólise, torna-se previsível

com uma grande sincronia de picos de LH, verificando-se a sincronização tanto do desenvolvimento folicular, como da regressão do CL (Ribeiro, 2015). No dia 0 (qualquer dia do ciclo éstrico) é administrada a GnRH para estimular a libertação de LH, podendo causar a ovulação de um folículo e, conseqüentemente, a formação de um corpo lúteo. Após a ovulação desse folículo, nos ovários, um outro folículo dominante inicia a sua influência. A FSH libertada é responsável pelo desenvolvimento da nova onda folicular. No dia 7, é administrada a $\text{PGF}_{2\alpha}$, promovendo a regressão do corpo lúteo ou do folículo luteinizado pela GnRH e no dia 9 (48 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$) repete-se a GnRH, originando novo pico de LH, que induz a ovulação do folículo pré-ovulatório, normalmente 24 a 32 horas depois (Pursley *et al.*, 1998). Está provado que a IA em tempo fixo (IATF), 16 horas após a última administração de GnRH, produz as melhores taxas de gestação (Pursley *et al.*, 1998). Segundo os mesmos autores, a aplicação da segunda dose de GnRH, 48 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$, concentra as ovulações num período de 8 a 12 horas, permitindo a IATF, 16 a 24 horas após a administração de GnRH. Segundo Pursley *et al.* (1995), num estudo com este protocolo sobre a dinâmica folicular em bovinos, todos os animais ovularam entre as 24 e 32 horas após a administração da segunda GnRH.

O protocolo Ovsynch poderá ser muito útil para ressincronizar vacas não gestantes, porque garante que todas elas sejam inseminadas, 10 dias após um diagnóstico de não gestação (Stevenson, 2005). Na ressincronização de vacas que não ficaram gestantes, pode iniciar-se um protocolo Ovsynch no dia 28, quando estas fêmeas são diagnosticadas como não gestantes ao exame ecográfico.

Vários estudos concluíram que é possível obter os melhores resultados de fecundação quando se inicia o Ovsynch entre o 5 e 12º dia do ciclo éstrico e a presença de um folículo de diâmetro igual ou superior a 10mm num dos ovários, também resulta em taxa de fecundação superior (Ribeiro, 2015).

Existem várias modificações do protocolo original, nomeadamente o Co-Synch (Figura 9), que consiste em associar a IA, à segunda administração de GnRH, tornando-se mais prático para o produtor e provocando menos “stress” à vaca. Com este protocolo, as fêmeas são inseminadas no momento da 2ª administração de GnRH, 72 horas depois da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Num estudo de McDougall *et al.* (2013), o Co-Synch resultou na mais alta taxa de concepção à 1ª IA, em comparação com outros protocolos. Um outro ensaio de Portaluppi & Stevenson (2005) demonstrou que atrasar a segunda GnRH, fazendo-a coincidir com a IATF poderia otimizar o processo de maturação do folículo dominante pré-ovulatório, resultando numa melhor taxa de gestação. Considerando a

rentabilização de tempo, mão-de-obra e diminuição de “stress” ao animal, o Co-Synch apresenta-se como uma alternativa prática ao Ovsynch.

Uma outra modificação é o protocolo Pré-Synch (Figura 10) em que se sincroniza previamente as vacas para que estas possam estar entre o dia 5 e 12 do ciclo éstrico quando a primeira GnRH é administrada, resultando numa maior resposta ovulatória e num aumento da taxa de gestação quando comparado com fêmeas submetidas ao Ovsynch clássico (Moreira *et al.*, 2001; El Zarkouny *et al.*, 2004). O Pré-Synch contempla duas administrações de PGF_{2α} com 14 dias de intervalo antes do início dos programas de Ovsynch ou Co-Synch. Portaluppi & Stevenson (2005) demonstraram que a altura ideal para a IATF, num protocolo combinado de Pré-Synch + Ovsynch, era às 72 horas após a administração da PGF_{2α}.

O protocolo G6G inicia-se com uma administração de PGF_{2α}, seguida 48 horas depois da administração de GnRH e início do Ovsynch ou Co-Synch, 6 ou 7 dias depois (Wiltbank & Pursley, 2014). Com este protocolo, Bello *et al.* (2006) aumentaram para 85 %, a percentagem de animais que ovularam após a administração da primeira GnRH e, consequentemente, a taxa de gestação, comparativamente a fêmeas não pré-sincronizadas. No entanto, num estudo mais recente, Ribeiro *et al.* (2011) avaliaram o uso do Pré-Synch e G6G e não encontraram, de uma forma geral, qualquer melhoria na sincronização da ovulação, comparativamente ao grupo controlo.

O protocolo Double-Ovsynch envolve a execução de dois protocolos Ovsynch consecutivos com um intervalo entre aplicações de 7 dias, resultando numa taxa de gestação superior comparativamente ao Pré-Synch-Ovsynch (Souza *et al.*, 2008). Estudos mais recentes (Ayres *et al.*, 2013) reportaram um aumento da taxa de gestação para este protocolo devido a uma melhor sincronização da ovulação, associada a dois factores: disponibilidade de um folículo dominante que ovulará após a terceira administração de GnRH e um aumento dos níveis de progesterona, anterior à administração de PGF_{2α}.

O protocolo Select Synch (Figura 12) combina a GnRH, para induzir a libertação de FSH e LH, com a PGF_{2α} 7 dias depois e, a IA é efectuada apenas, após a observação do estro (Stevenson, 2005).

Actualmente, o Ovsynch e as suas modificações são os programas mais utilizados em vários países e continentes (Bisinotto *et al.*, 2014).

Vários estudos reportam a utilização de protocolos combinados de CIDR com Ovsynch ou Pré-Synch + Ovsynch, em vacas de leite (Moreira *et al.*, 2000; Pursley *et al.* 2001; El-Zarkouny *et al.*, 2004).

A taxa de gestação com a utilização do CIDR tem melhorado, mas os resultados não são consistentes nos diferentes estudos (Stevenson, 2005). Este autor defende que em alguns casos, o CIDR tende a reduzir a taxa de gestação, embora exista uma tendência para que nas vacas anéstricas haja melhoria da taxa de gestação com um tratamento combinado de CIDR + Ovsynch. A suplementação de progesterona (P4) durante um protocolo Ovsynch (Ovsynch + CIDR) resulta numa melhoria da taxa de gestação comparativamente ao Ovsynch clássico, quando existe no grupo, um número elevado de vacas não cíclicas (El-Zarkouny *et al.*, 2004) ou fêmeas com níveis baixos de P4 circulante, antes da administração da PGF_{2α} (Stevenson *et al.*, 2006). A associação de um dispositivo intravaginal de P4 ao protocolo Co-Synch resultou em melhorias da taxa de gestação em vacas de aptidão leiteira (Bartolome *et al.*, 2009).

A ressincronização da ovulação em vacas diagnosticadas como não gestantes após a IATF recebe o nome de Re-Synch e pode combinar qualquer um dos protocolos acima referidos, sendo o objectivo principal reduzir o intervalo de tempo entre inseminações (Galvão *et al.*, 2007). É fundamental re-inseminar o mais cedo possível todas as vacas que não ficam gestantes à 1ª inseminação de modo a não comprometer a eficiência reprodutiva (Stevenson, 2003). Foram sugeridos vários protocolos para ressincronizar o estro e aumentar o número de vacas re-inseminadas (Chenault *et al.*, 2003). No entanto, considerando que existe dificuldade em observar o estro nas explorações de alta produção, a IATF faz parte integrante da maioria das estratégias de resincronização (Bartolome *et al.*, 2009). Estes autores testaram a sincronização e ressincronização em vacas leiteiras comparando taxas de gestação à 1ª IA de animais submetidos ao tratamento Pré-Synch-Ovsynch com e sem CIDR combinado com o Ovsynch e, comparando taxas de gestação à 2ª IA, após ressincronização, com e sem CIDR inserido entre os dias 14 e 23 depois da 1ª IA, com início do protocolo de 7 dias de Ovsynch (dia 23), antes do diagnóstico de gestação por ecografia, ao dia 30 após a IA. Concluíram que a combinação do CIDR com Pré-Synch-Ovsynch não melhorava a taxa de gestação, mas reduzia a mortalidade embrionária (ME), entre os 30 e 55 dias. O CIDR promove uma melhoria da taxa de gestação apenas nas vacas com elevados níveis de progesterona no momento da aplicação do CIDR. Na ressincronização, a aplicação de CIDR entre o 14º e 23º dia após a 1ª IA, não melhora a taxa de gestação. No entanto, a sua aplicação fá-lo, nas vacas não gestantes que possuem CL, no momento do diagnóstico por ecografia aos 30 dias.

Pursley *et al.* (1997) demonstraram que vacas submetidas à IATF, em programas de ressincronização após diagnóstico de gestação negativo, reduziram o período para

ficarem gestantes em 19 dias, em comparação com as fêmeas inseminadas apenas depois da detecção do cio.

Azevedo *et al.* (2014) observaram que vacas de aptidão leiteira em regime de semi-estabulação e submetidas a um protocolo Co-Synch + CIDR (Figura 11) apresentaram uma melhoria da taxa de gestação, relativamente às sujeitas ao Ovsynch clássico, tendo também sido consideradas as gestações, após 2ª IA das vacas não gestantes à IATF e com retorno regular ao estro. Este protocolo pode também influenciar positivamente a taxa de gestação em efectivos onde se re-inseminam, após estro natural, os animais não gestantes com retorno ao cio, por volta dos 21 dias após IATF.

Segundo Zulu *et al.* (2000), o tratamento com PRID é efectivo em vacas leiteiras em anestro apesar da taxa de concepção ser baixa. Segundo os mesmos autores para melhorar esta taxa, deve associar-se ao tratamento com PRID, a administração de eCG (gonadotrofina coriónica equina) ou GnRH, 24 a 49 horas após a remoção do PRID e reduzir o tempo de permanência do dispositivo intravaginal. Segundo De Rensis *et al.* (2010) existem benefícios na inclusão hCG (gonadotrofina coriónica humana) em protocolos de sincronização de ovulação em vacas em lactação. Ao actuar nas células foliculares, independentemente da adeno-hipófise, com um efeito de duração superior ao provocado pela libertação endógena de LH, a sua utilização em situações de subfertilidade de vacas de alta produção parece ser promissora. A inclusão desta gonadotrofina exógena, em substituição da primeira ou da segunda administração de GnRH do protocolo Ovsynch, recebeu a denominação de HPG ou GPH, respectivamente havendo, no entanto, alguma inconsistência de resultados entre os artigos referenciados por aqueles investigadores.

Nas novilhas de substituição também se utilizam programas deste tipo, garantindo a entrada em produção, por lotes. São utilizadas várias combinações de protocolos como acetato de melengesterol (MGA), CIDR, GnRH e PGF_{2α}.

A suplementação na alimentação com MGA (0,5mg por novilha/dia) durante 14 dias, seguida da administração de PGF_{2α}, 19 dias depois, resulta usualmente em estro, 5 dias depois (Stevenson, 2005). A IATF das novilhas associada à administração de GnRH, 72 horas depois da prostaglandina é possível, mas a taxa de concepção é aproximadamente de 60% a 75% dos resultados obtidos com novilhas inseminadas após observação do estro (Stevenson, 2005). Este tratamento tem ainda, a capacidade de induzir a puberdade em algumas novilhas em período peri-púbere (Lamb *et al.*, 2004).

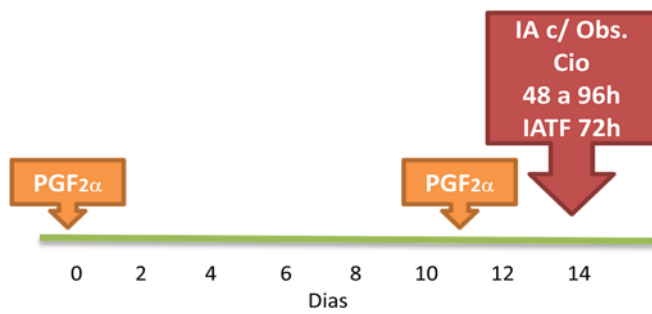


Figura 7. Esquema representativo do protocolo de dupla administração de $PGF_{2\alpha}$, com 10 a 12 dias de intervalo

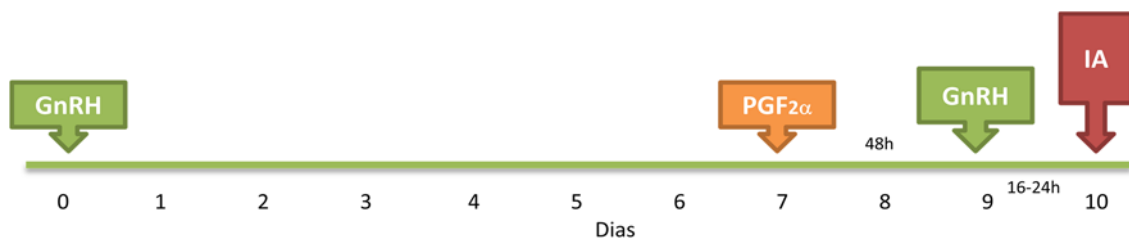


Figura 8. Esquema representativo do protocolo Ovsynch

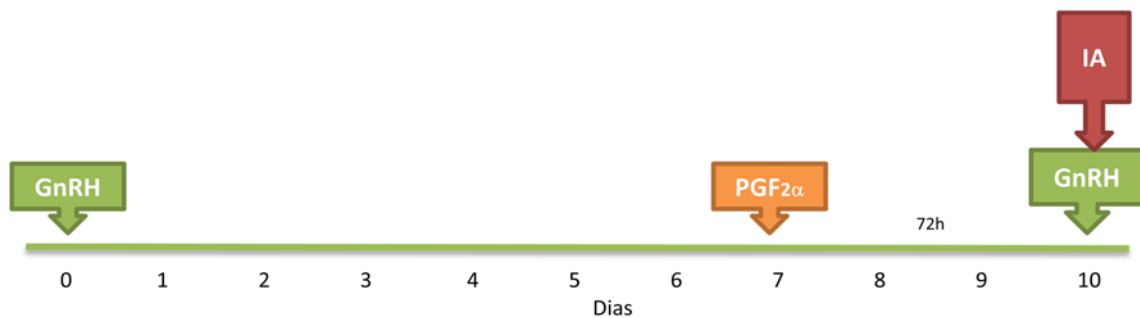


Figura 9. Esquema representativo do protocolo Co-Synch



Figura 10. Esquema representativo do protocolo Pré-Synch

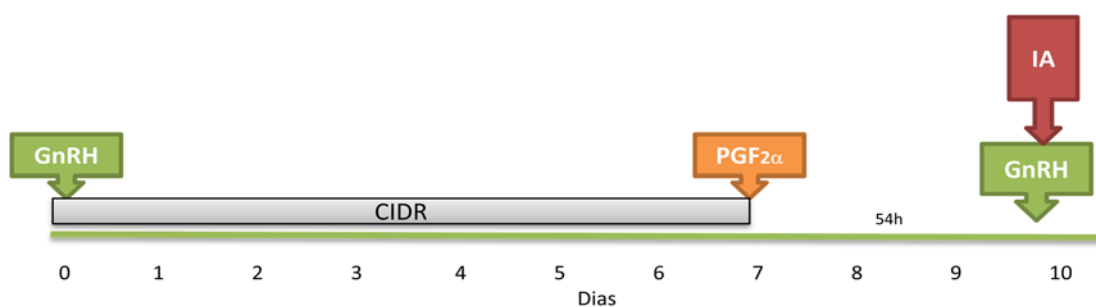


Figura 11. Esquema representativo do protocolo combinado Co-Synch + CIDR

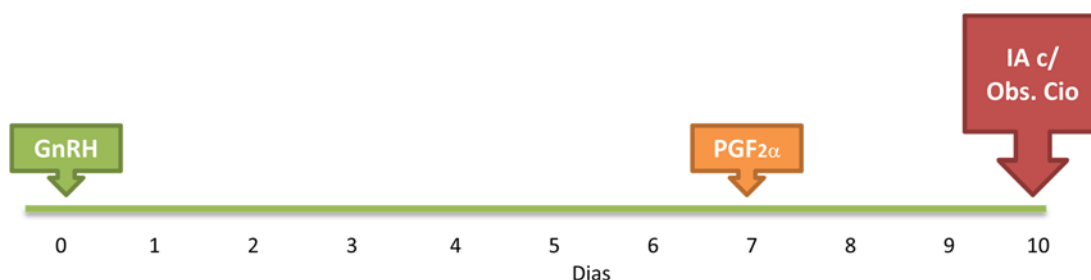


Figura 12. Esquema representativo do protocolo Select Synchron

9. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico precoce de gestação é economicamente importante para as explorações leiteiras e, conseqüentemente, um elemento chave na gestão da eficiência reprodutiva da exploração. Com efeito, a identificação precoce de vacas e novilhas não gestantes após a inseminação, pode melhorar a eficiência reprodutiva e a taxa de fecundação, diminuindo o intervalo de tempo necessário para que as fêmeas voltem a ser inseminadas (o mais rapidamente possível). Por outro lado, em fêmeas que foram diagnosticadas como gestantes, cerca de 15% das gestações podem ser perdidas entre o diagnóstico precoce de gestação aos 28/30 dias e os 56/60 dias de gestação (Santos *et al.*, 2004) e é importante que voltem a ser inseminadas e que se avalie a taxa de mortalidade embrionária tardia e fetal precoce.

Existem várias formas de verificar se a fêmea está gestante, desde a observação do retorno ao cio (aos 21-24 dias após a IA), palpação transrectal, ultrassonografia transrectal e/ou doseamentos hormonais.

Quando uma fêmea bovina não volta a ser observada em cio 21 dias após a IA espera-se que a mesma tenha ficado gestante. No entanto, se o animal apresentar cio considera-se não gestante e volta-se a inseminar. Porém, sabemos que cerca de 7% das vacas fazem cio mesmo estando gestantes de forma que, este método não é fiável.

A palpação transrectal é o método mais antigo, mais expedito e mais económico e por isso, mais amplamente utilizado para diagnóstico precoce de gestação em bovinos de leite (Extension, 2010). O diagnóstico de gestação precoce (30 a 60 dias) baseia-se na assimetria dos cornos uterinos, na sua tonicidade e no conteúdo flutuante do corno gravídico, no deslizamento das membranas cório-alantóicas e na palpação da vesícula embrionária. Em estádios mais avançados da gestação são palpáveis os placentomas e o feto. A artéria uterina média aumenta o calibre e pode detectar-se o frémito (Ribeiro, 2015).

Esta técnica implica que seja efectuada por um técnico com bastante experiência e que manipule o útero com o máximo de cuidado.

Pode recorrer-se também a métodos laboratoriais, tais como o doseamento no plasma de proteínas associadas à gestação (PAG), a partir do 35º dia após o estro e/ou doseamento da P4, no plasma ou no leite, do 21º ao 24º dia após o cio, para um efectivo diagnóstico de não-gestação. A determinação no dia 29 da PAG pelo método ELISA é fiável (98,7%), mas trata-se de um teste bastante dispendioso e que tem de ser feito em laboratório, o que limita a sua aplicação em termos comerciais (Ribeiro, 2015).

A introdução da ecografia na rotina de diagnóstico do tracto reprodutivo permitiu um grande avanço em termos de diagnóstico de gestação precoce e na ajuda à compreensão de várias questões da esfera genital. O uso da ultrassonografia em tempo real permite, com grande precisão, a visualização da vesícula embrionária a partir do 28º dia após a IA. Contudo, é importante que seja realizado novo exame aos 60-80 dias para que possam ser detectadas perdas do conceito, entretanto ocorridas. O exame ecográfico exige ampla experiência de palpação rectal e conhecimento aprofundado dos fundamentos do diagnóstico ultrassonográfico.

No momento da reconfirmação da gestação aos 60-80 dias, pode efectuar-se a sexagem fetal. A sexagem do feto é importante e apreciada em algumas explorações porque permite: detectar gestações gemelares de macho e fêmea; seleccionar para venda novilhas ou vacas gestantes de machos; um maneio cuidado da gestação em algumas explorações onde o valor da fêmea é geneticamente elevado; e, melhor maneio do parto, com maior controlo da distócia associada ao nascimento de machos.

10. Aplicações reprodutivas da ultrassonografia em fêmeas bovinas Frísias Holstein

Em muitos casos, a palpação transrectal tem vindo a ser substituída pela ultrassonografia transrectal na realização dos diagnósticos de gestação ou diagnósticos associados a infecções uterinas e/ou ováricas. Adicionalmente, esta tecnologia tem acrescentado outros benefícios, tais como: sexagem fetal, detecção precoce do embrião e avaliação da sua viabilidade, detecção precoce de gestações gemelares e ainda, pelo facto de ser menos invasiva que a palpação transrectal. Apesar de não ser consensual, alguns autores defendem que a palpação transrectal pode aumentar o risco de morte embrio-fetal dependendo do estágio da gestação e do método utilizado. Segundo alguns autores, pressionar ligeiramente a vesícula embrionária na palpação transrectal aumenta o risco de morte embrionária particularmente entre o dia 35 e 49 de gestação (Ball & Carrol, 1963). Outros sugerem que a palpação da membrana ou da vesícula embrionária aumenta a taxa de morte embrionária (Abbitt *et al.*, 1978).

A utilização da ultrassonografia no exame reprodutivo de fêmeas bovinas teve início nos anos 80 (DesCôteaux *et al.*, 2009). Desde então, foi feita muita investigação para desenvolver aplicações práticas na reprodução e nos diagnósticos, na esfera da medicina bovina. Segundo DesCôteaux *et al.* (2009), uma sonda rectal linear de 5 Megahertz (MHz) é a mais versátil e mais comumente utilizada nos exames reprodutivos bovinos. Os aparelhos mais recentes, normalmente incluem sondas de multifrequências que funcionam entre 3,5 e 10 MHz. A imagem é vista através de um monitor ou com óculos binoculares. Estes autores recomendam examinar em primeiro lugar os ovários para auxiliar na interpretação do resto do tracto reprodutivo (p. ex., probabilidade de gestação, diagnóstico de gémeos, quistos ováricos) e para se obter uma maior precisão de diagnóstico.

Depois do parto, uma fêmea passa por uma série de barreiras fisiológicas até que possa ser estabelecida uma nova gestação. A monitorização do tracto reprodutivo feminino através da ultrassonografia tem resultado em melhorias significativas no diagnóstico da sua fisiopatologia. Paralelamente é importante monitorizar os factores de risco para uma quebra da fertilidade, tais como: doenças metabólicas, claudicação, mamites e diversas doenças infecciosas.

A ultrassonografia permite pois, determinar a proporção de animais com pós-parto normal, avaliar a involução uterina e o retorno à ciclicidade (Sheldon *et al.*, 2009). Permite ainda, uma diferenciação mais fiável das estruturas ováricas do que por palpação (Ribadu *et al.*, 1994). A presença de um corpo lúteo (CL) num dos ovários evidencia a maturidade sexual nas novilhas e a ciclicidade nas vacas (DesCôteaux *et al.*, 2010). É possível estimar a idade do CL juntamente com a avaliação do útero, apesar dos corpos lúteos variarem em termos da sua ecotextura (DesCôteaux *et al.*, 2010). O diâmetro do CL está altamente correlacionado com a concentração de progesterona circulante (Ginther, 1998). No entanto, no final do ciclo éstrico a concentração de P4 plasmática declina, 2 a 3 dias antes da redução de tamanho do CL (Ribadu *et al.*, 1994). A ecogenicidade do tecido lúteo é elevada durante a formação do CL, decresce no dia 2 e depois permanece constante durante o diestro, diminuindo novamente, 1 a 2 dias antes do declínio da P4. Com a idade, o CL torna-se hipoeecogênico (escuro) quando comparado com o estroma ovárico circundante devido à grande concentração de vasos sanguíneos que o alimentam (DesCôteaux *et al.*, 2009). Durante os primeiros 10 dias do ciclo éstrico, 30 a 50% dos corpos lúteos possuem uma cavidade que pode ser facilmente identificada na imagem ultrassonográfica (Figura 15 e 16) (DesCôteaux *et al.*, 2009). Um CL com uma cavidade central é usualmente uma estrutura jovem e funcional (DesCôteaux *et al.*, 2009).

A ultrassonografia teve um papel muito importante na confirmação das ondas foliculares (Smith *et al.*, 2014). As vacas têm, normalmente, 2 ou 3 ondas foliculares por ciclo, emergindo (a partir de folículos de 4mm de diâmetro) aproximadamente no dia 1, 9 e 16 do ciclo éstrico (Crowe, 2008). Se um corpo lúteo tem mais de 20mm de diâmetro, adquiriu receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo sensível à uma administração exógena desta substância (Figura 18).

A ecogenicidade do líquido folicular do antrum é bastante consistente ao longo da existência do folículo. A da parede do folículo, em folículos anovulatórios, reduz-se a partir do momento que se atinge o tamanho máximo e volta a aumentar quando o folículo começa a regredir durante o processo de atresia (Smith *et al.*, 2014). A espessura da parede uterina, contractilidade do útero, ecogenicidade e quantidade de fluido no lúmen uterino, aumentam antes da ovulação (Ginther, 1998). A presença de fluido no lúmen uterino antes, mas não depois da ovulação, é útil para diferenciar a fase do ciclo éstrico na presença de um CL pequeno (acabado de formar, dia 3 ou 4 ou a sofrer luteólise, dia 19 a 20 do ciclo) (Figura 17) (Smith *et al.*, 2014).

Os quistos ováricos são definidos como estruturas com mais de 25mm de diâmetro que persistem por mais de 10 dias, na ausência de um CL (Smith *et al.*, 2014). O quisto folicular que sofra uma luteinização parcial torna-se um quisto luteínico que responde à administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os quistos foliculares têm uma espessura de parede <3mm e, os quistos luteínicos têm-na $\geq 3\text{mm}$ (Smith *et al.*, 2014). A ultrassonografia melhora a sensibilidade e especificidade do diagnóstico de quistos à superfície do ovário (Douthwaite & Dobson, 2000).

A persistência do corpo lúteo e falhas na ovulação devido a atresia do folículo dominante ou mesmo, à não diferenciação de folículos, no início da onda folicular (Peter *et al.*, 2009), atrasam o retorno à ciclicidade normal.

Num ovário de uma fêmea anéstrica não existe CL e/ou folículos de grandes dimensões, ao invés, podem estar presentes folículos com menos de 2 a 4 mm de diâmetro (DesCôteaux *et al.*, 2009).

A avaliação ultrassonográfica do útero permite diferenciar as diferentes fases do ciclo éstrico. A involução do cérvix e do útero no pós-parto também podem ser monitorizadas através da ultrassonografia, bem como o efeito de agentes patogénicos uterinos sobre o crescimento folicular e lúteo (Sheldon *et al.*, 2009).

Durante o estro, o endométrio fica mais ecogénico e a interface entre o endométrio e o miómetro revela um leito vascular. Adicionalmente, pode observar-se alguma acumulação de líquido no lúmen uterino que pode ser confundido com gestação precoce (Carrière *et al.*, 2005). O peri-estro (3 dias antes e 4 dias depois do estro), período que inclui o pró-estro (3 a 4 dias antes do estro), o estro e o início do

metaestro caracteriza-se por elevados níveis de estrogénio em circulação e um aumento de aporte sanguíneo para o útero (DesCôteaux *et al.*, 2010). À palpação transrectal, o útero apresenta-se túrgido (DesCôteaux *et al.*, 2009). O cérvix encontra-se parcialmente aberto deixando que o muco produzido pelas glândulas do endométrio e do cérvix seja libertado para o exterior (DesCôteaux *et al.*, 2009). Estas alterações do útero são visíveis ao exame ultrassonográfico através da diminuição da uniformidade nas camadas cinzentas e da aparência edemaciada da parede uterina (DesCôteaux *et al.*, 2010). Durante o diestro, há elevados níveis de progesterona em circulação, a parede uterina encontra-se mais fina e os cornos uterinos são mais difíceis de observar. A imagem obtida é normalmente mais uniforme e o útero não revela líquido no seu lúmen (DesCôteaux *et al.*, 2009).

As principais patologias que podem ser encontradas no útero são: metrite puerperal, metrite clínica, endometrite clínica e subclínica e piómetra (DesCôteaux *et al.*, 2010).

O diagnóstico de metrite puerperal e metrite clínica resulta de um registo de um útero enorme contendo corrimento de cheiro fétido e de cor vermelho-acastanhado, associando-se à temperatura rectal elevada, $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$, da diminuição da produção de leite e de outros sinais de toxémia. Ocorre normalmente, aos primeiros 10 a 15 dias de lactação, embora possa estender-se aos 21 dias (Sheldon *et al.*, 2006). Apesar deste tipo de diagnóstico dispensar o exame ecográfico, usualmente a imagem ultrassonográfica mostra uma parede uterina espessa e o líquido no lúmen apresenta variações nos graus de ecogenicidade, com inúmeras partículas hiperecogénicas em suspensão (DesCôteaux *et al.*, 2010).

Na endometrite clínica (Figura 13 e 14), as vacas apresentam um útero anormalmente aumentado de volume e um corrimento vaginal purulento ou mucopurulento, após os 21 dias do parto. Nas endometrites subclínicas (crónicas) verifica-se ausência de corrimento vaginal purulento apesar do endométrio se encontrar inflamado (DesCôteaux *et al.*, 2009).

A piómetra é definida como a acumulação de conteúdo purulento no lúmen uterino na presença de um CL persistente e um cérvix fechado (DesCôteaux *et al.*, 2010). Esta patologia uterina é normalmente encontrada para além do período voluntário de espera. O exame ecográfico revela uma acumulação variável de líquido purulento que não é uniforme em termos de ecogenicidade, dada a existência de partículas hiperecogénicas (DesCôteaux *et al.*, 2010). O diâmetro dos cornos uterinos varia geralmente, entre os 5 e 20 cm (DesCôteaux *et al.*, 2010).

O diagnóstico precoce de gestação com recurso ao ecógrafo, é um método rápido, seguro e com um custo aceitável para os produtores de leite que desejam

melhorar a performance reprodutiva da sua exploração. Pode ser executado com um excelente nível de precisão a partir do 27º dia após a IA (DesCôteaux & Fetrow, 1998). O ultrassonograma de uma gestação precoce mostra um lúmen uterino contendo uma quantidade variável de líquido anecogénico. A visualização da vesícula embrionária só acontece depois dos 28-30 dias de gestação (Figura 19). A partir do dia 30, a membrana amniótica pode ser visualizada como um invólucro ecogénico com excelente reflexo (Carrière *et al.*, 2005). A estimativa da idade do embrião ou do feto é possível em alguns ecógrafos, através da mensuração da distância entre a proeminência occipital e a garupa. Este método é mais preciso após os 55 dias de gestação (DesCôteaux *et al.*, 2010). A partir do dia 45 (Figura 20 e Figura 22), já se observam movimentos fetais (Kastelic *et al.*, 1998).

O diagnóstico de gestações gemelares (Figura 21) e a sexagem fetal (Figuras 23 e 24) são normalmente efectuados durante a reconfirmação da gestação, após os 55 a 60 dias (DesCôteaux *et al.*, 2010). A identificação de gémeos ajuda no manejo das vacas portadoras desse tipo de gestação, permitindo ajudar a garantir a gestação até termo. O tubérculo genital, que é a estrutura fetal que dá origem ao pénis ou ao clitóris, é visível ao dia 45, mas só alcança a sua localização definitiva entre os dias 55 e 58 de gestação (DesCôteaux *et al.*, 2010). A posição do tubérculo relativamente ao umbigo ou à cauda determina o diagnóstico do sexo (Carrière *et al.*, 2005). Depois do segundo mês de gestação conseguem-se visualizar os órgãos na cavidade torácica (coração e pulmões) e no abdómen (fígado, rins, bexiga, rúmen, abomaso), e uma avaliação cuidadosa permite diagnosticar algumas anormalidades fetais (DesCôteaux *et al.*, 2010).

A mortalidade embrionária (tardia), entre os 28 e 42 dias de gestação, é de cerca de 10% a 15% (Carrière *et al.*, 2005; DesCôteaux *et al.*, 2010). A mortalidade fetal é de aproximadamente de 6% e 3%, respectivamente para os períodos entre os dias 42 e 56 e entre os dias 56 e 98 (Ginther, 1998). Os ultrassonogramas clássicos que permitem diagnosticar a morte embrionária ou fetal revelam, geralmente, uma quantidade significativa de detritos hiperecogénicos, dentro da membrana amniótica ou no líquido alantóico, uma pobre definição das estruturas observadas e ausência de batimento cardíaco (Carrière *et al.*, 2005; DesCôteaux *et al.*, 2010).

A ultrassonografia tem também diversas aplicações relacionadas com a recolha e transferência de embriões, programas de fertilização *in vitro*, programas de sincronização de cios e de resincronização (DesCôteaux *et al.*, 2010).

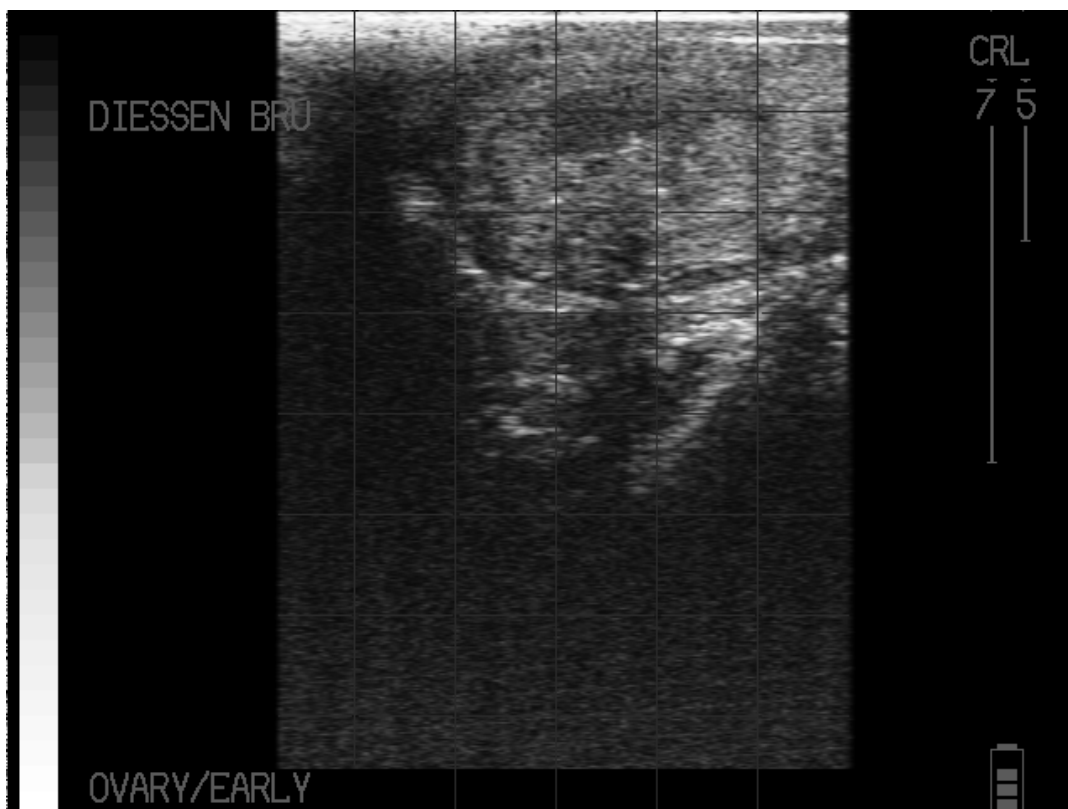


Figura 13. Útero com endometrite, 30 dias após o parto (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

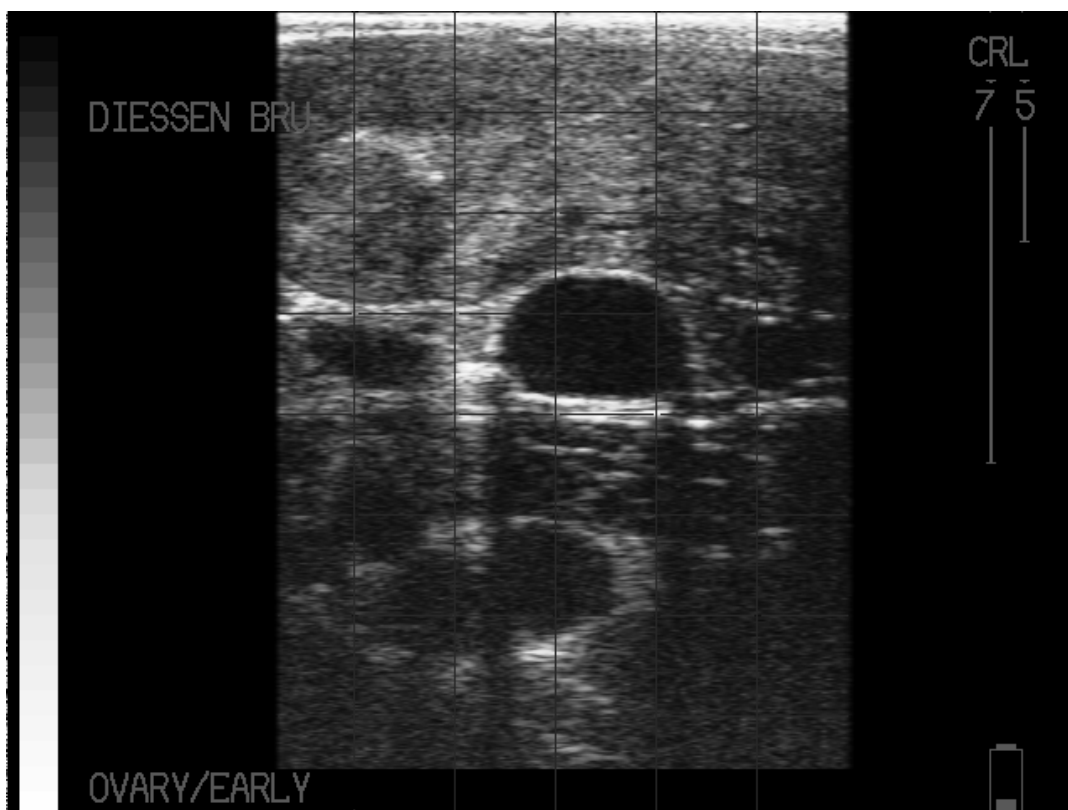


Figura 14. Útero com endometrite, 24 dias após o parto (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)



Figura 15. Ovário com CL 13 dias após o cio (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

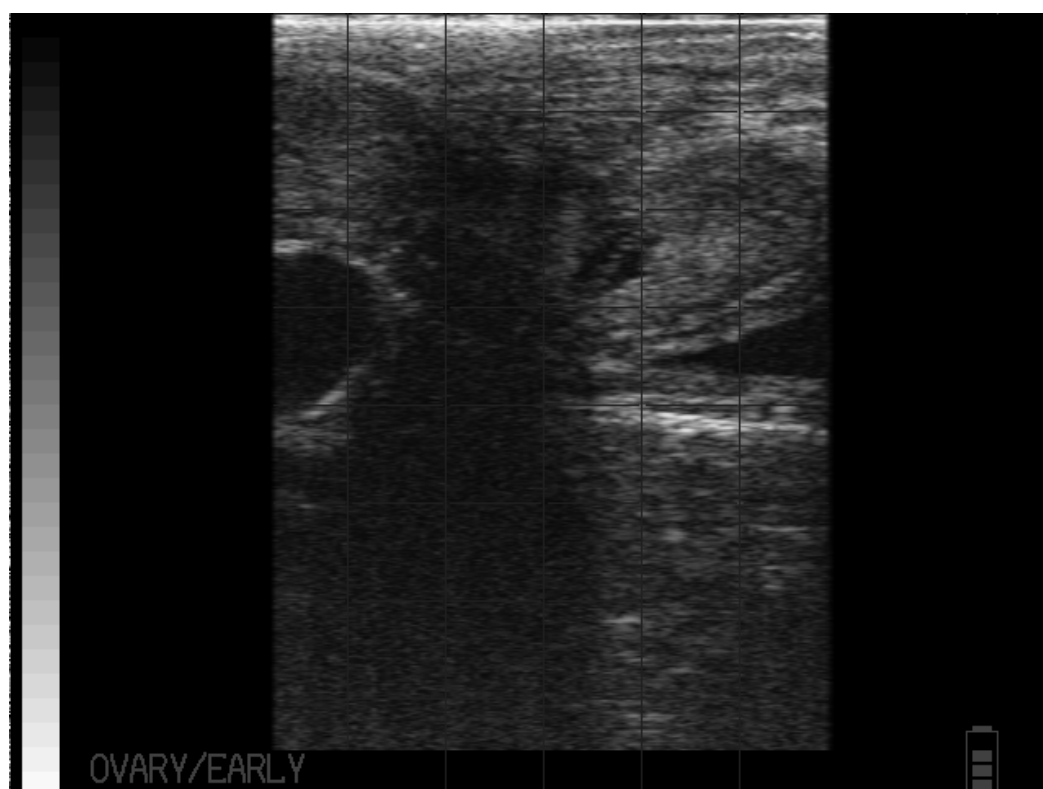


Figura 16. Ovário com CL cavitário (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)



Figura 17. Ovário com FL de 1,2cm (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)



Figura 18. Ovário com FL e CL, fêmea seleccionada para Ovsynch (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

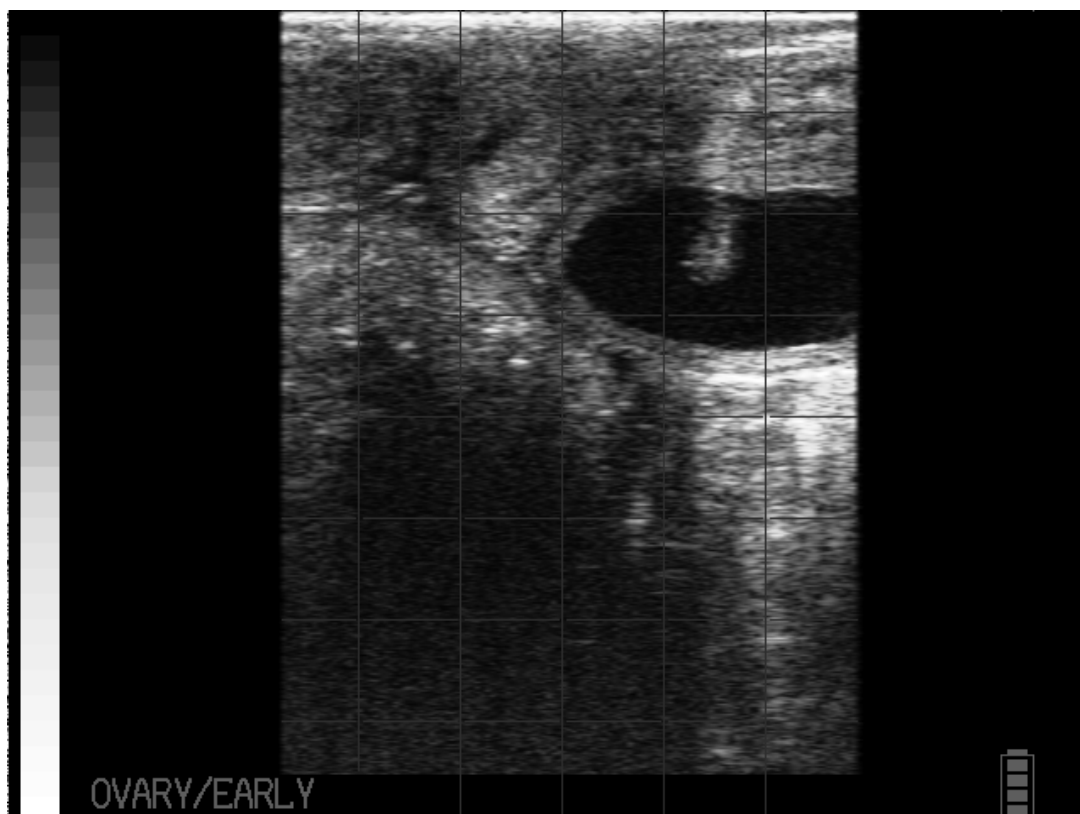


Figura 19. Embrião com 28 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)



Figura 20. Útero com gestação de 45 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)



Figura 21. Gémeos com 38 dias (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

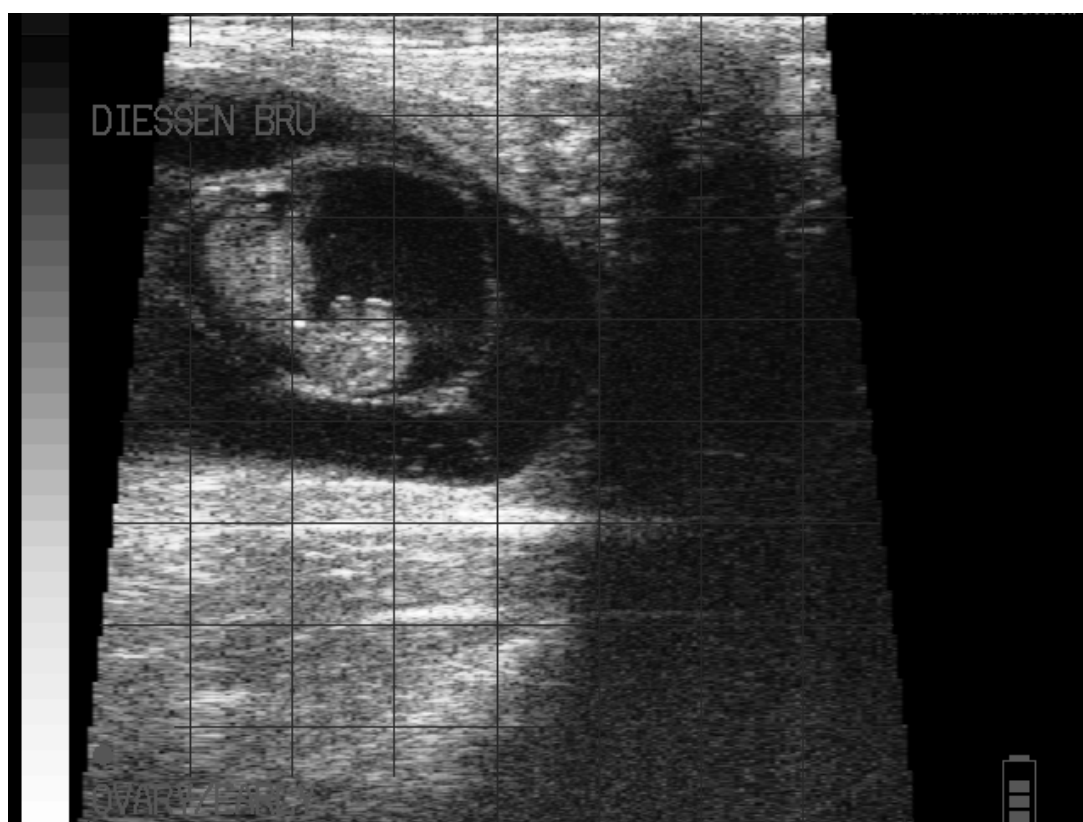


Figura 22. Feto com 50 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

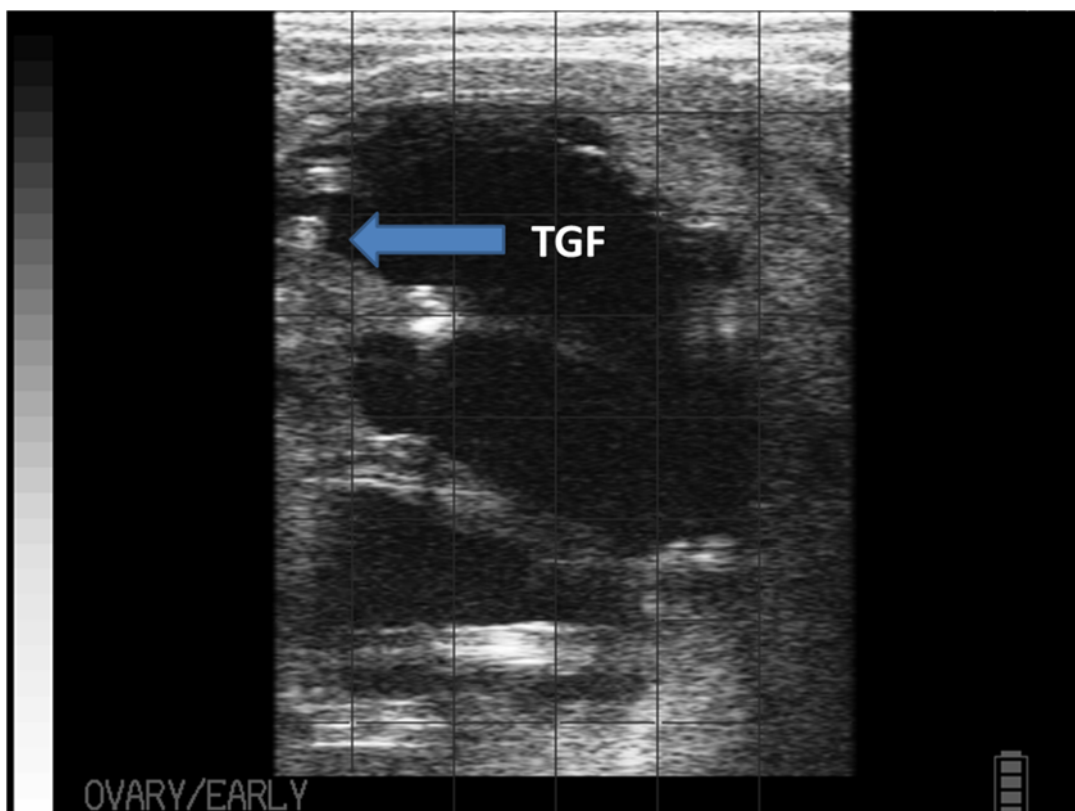


Figura 23. Sexagem fetal, tubérculo genital de fêmea com 65 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

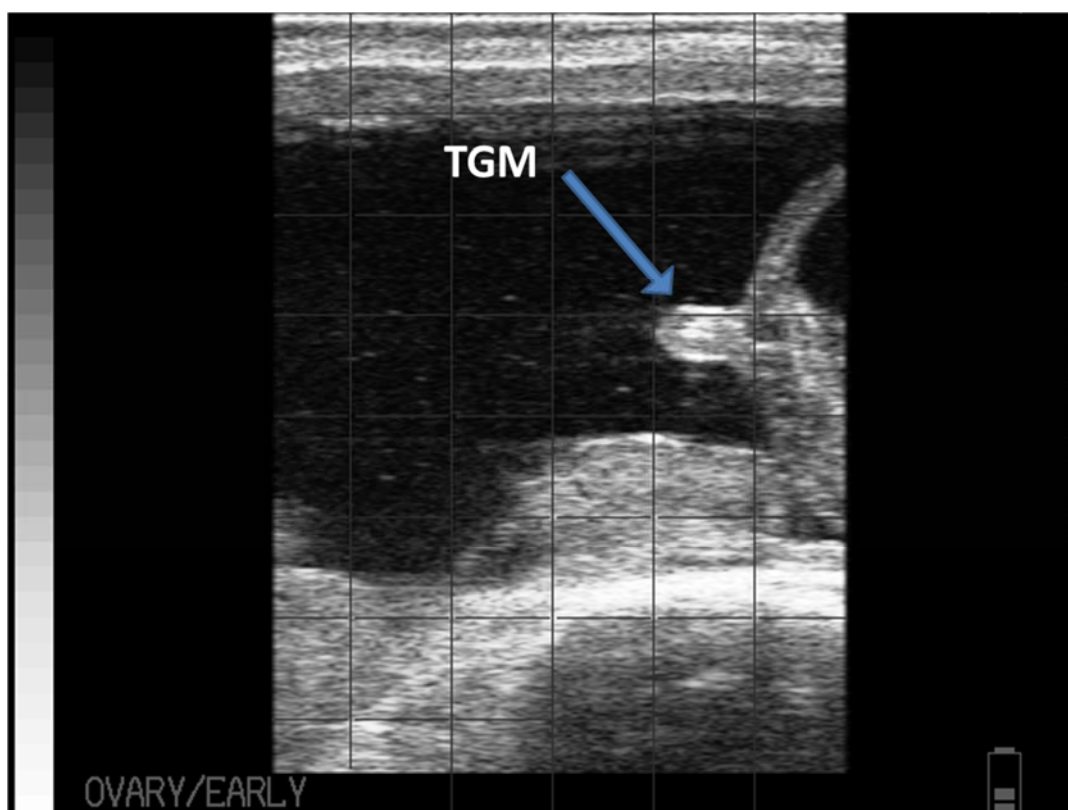


Figura 24. Sexagem fetal, tubérculo genital de macho com 65 dias de gestação (imagem cedida pelo Dr. Leandro Pires e Dr. Bruno Carneiro)

11. Utilização do sémen sexado em novilhas Frísias Holstein

O sémen sexado (SS) de bovinos está comercialmente disponível em vários países e é, sobretudo, utilizado nas explorações de leite. Actualmente, nos bovinos, o sémen é sexado por citometria de fluxo com base numa diferença de 3,8% no conteúdo de ADN de espermatozóides com cromossoma X, relativamente aos possuidores do Y (Seidel, 2012).

A possibilidade de seleccionar as populações de espermatozóides X e Y e deste modo eleger o sexo das crias antes da concepção, está a desbravar um novo caminho na produção animal. A sua utilização pode contribuir para a expansão de uma exploração leiteira aumentando o número de vitelas de reposição, sem a necessidade de aquisição no exterior.

A pré-selecção do sexo vai, pois, acelerar o ganho genético, melhorar a biossegurança da exploração, reduzir as incidências de distócias e reduzir o número de animais de sexo não desejado. Adicionalmente, vão ser necessárias menos vacas para produzir as novilhas de reposição e vão existir melhores oportunidades para utilização de sémen de touros de aptidão cárnica nas fêmeas mais velhas e ou geneticamente inferiores (Seidel, 2007).

O sémen sexado é recomendado para as novilhas, porque são mais férteis, mais propensas a distócias e, em média, geneticamente superiores quando comparadas com vacas mais velhas, de gerações anteriores (Seidel, 2007). Para qualquer tipo de sémen, SS ou sémen convencional (SNS), as novilhas Holstein apresentam maior fertilidade e obtêm-se melhores taxas de concepção, quando se compara com vacas em lactação (Garner & Seidel, 2008; Seidel & Schenk, 2008).

Até ao momento, a única técnica efectiva que permite a separação das células espermáticas de acordo com a presença de cromossomas X ou Y, é a citometria de fluxo, desenvolvida em 1989 por Johnson e colaboradores (Johnson *et al.*, 1989; Johnson, 2000). Vários melhoramentos têm sido introduzidos no processo, aumentando o rendimento e a eficiência da triagem (Sharpe & Evans, 2009).

A citometria de fluxo baseia-se na diferente fluorescência emitida pelos espermatozóides, dada a diferença de quantidade de ADN entre o espermatozóide X e o Y (Johnson, 2000). A quantificação do conteúdo em ADN é possível pela utilização de um marcador fluorescente, o Hoechst 33342, que se liga às regiões Adenina-Timina da hélice do ADN (Johnson *et al.*, 1987). Através da citometria de fluxo, o Hoechst 33342, após ligação ao ADN é excitado por feixe laser ultravioleta e emite uma fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida por um espermatozóide marcado e excitado é directamente proporcional ao seu conteúdo em ADN. Assim, a

fluorescência emitida por um espermatozóide bovino X será superior em 3,8% àquela emitida por um espermatozóide Y (Johnson, 2000).

Apesar de se obter no sémen sexado uma fiabilidade de 90% para o sexo selecionado, a sua fertilidade está comprometida, quando comparado com o sémen convencional (Seidel, 2012).

Esta quebra de fertilidade do sémen sexado é atribuída ao número de espermatozoides por dose seminal e também, aos danos neles provocados durante o processo de sexagem (Seidel & Garner, 2002). Isto inclui a sua incubação com o marcador Hoechst 33342, a diluição do esperma, a exposição a elevadas pressões hidrostáticas, aos efeitos do laser, e por fim, a centrifugação para a sua concentração. Depois da sexagem, os espermatozoides estão já parcialmente capacitados, resultando num período de vida útil mais curto e, conseqüentemente, na redução da capacidade fertilizante (Vazquez *et al.*, 2003). Durante o processo da citometria de fluxo, os espermatozoides são sujeitos a “stress” mecânico e químico que induzem a formação de radicais oxigenados livres, a alterações estruturais e diminuição da capacidade funcional (viabilidade, integridade do acrossoma, motilidade, integridade do ADN e fertilidade), tudo isto conduzindo invariavelmente, à morte celular (Rath *et al.*, 2003).

Estudos iniciais (Seidel *et al.*, 1999), indicaram a possibilidade de se obterem taxas de concepção com palhinhas de sémen sexado descongelado contendo 1 a $1,5 \times 10^6$ de Spz, de 60% a 90% da obtida com sémen convencional descongelado contendo 20×10^6 Spz. Estes estudos preliminares foram confirmados por diferentes trabalhos que apresentaram taxas de concepção com sémen sexado descongelado (2×10^6 Spz/palhinha) de cerca de 70% a 80% das obtidas com sémen convencional descongelado (15 a 20×10^6 Spz/palhinha) em novilhas e vacas em lactação (DeJarnette *et al.*, 2010; Norman *et al.*, 2010). Foram reportadas em alguns trabalhos, taxas de concepção à 1ª IA superiores a 50% (Weigel, 2004; Borchersen & Peacock, 2009). Healy *et al.* (2013) obtiveram taxas de concepção à 1ª IA mais baixas, com variações entre 39% a 57%, do que as apresentadas noutros trabalhos (Borchersen & Peacock, 2009). Norman *et al.* (2010) registaram uma taxa de concepção média por novilha, de 56% para SNS e de 39% para SS.

Para fazer face aos custos da tecnologia da sexagem do sémen, reduz-se a população espermática por palhinha, relativamente ao normalmente usado com o sémen convencional, utilizando-se cerca de 2 milhões de espermatozoides sexados, por palhinha congelada (Seidel *et al.*, 1999), sendo esta, certamente, mais uma das causas referidas para a diminuição da fertilidade das doses deste tipo de sémen (Seidel *et al.* 1997). Outro ponto crítico do processo é a variação entre touros na

tolerância aos procedimentos de sexagem. O sémen de touros de boa fertilidade apresenta maior tolerância ao procedimento de sexagem quando comparado com os de baixa fertilidade (Frijters *et al.*, 2009). As diferenças de fertilidade entre os reprodutores podem afectar significativamente as taxas de concepção quando se utiliza SS (DeJarnette *et al.*, 2008).

Melhoramentos recentes nos processos de selecção do sémen, especialmente a diminuição da pressão hidrostática na citometria de fluxo, têm resultado em menores danos para o sémen, quando comparado com os procedimentos para a sexagem do sémen que eram vulgares antes de 2002 (Suh & Schenk, 2003). Com estas melhorias e com a optimização dos procedimentos de criopreservação têm-se obtido taxas de concepção de cerca de 90% das obtidas com o sémen convencional, em animais sujeitos a um bom maneio, quando excluídos os touros de baixa fertilidade (Seidel, 2003).

Num efectivo de leite, as vantagens da utilização do SS estão preferencialmente relacionadas com o aumento do número de fêmeas, descendentes das melhores vacas do efectivo. A reposição eficiente desse mesmo efectivo será possível, inseminando com sémen portador do cromossoma X apenas 30 a 40% das fêmeas. Os restantes animais poderão ser sujeitos a cruzamentos, privilegiando o vigor híbrido e o potencial para a produção de carne das futuras crias. As vacas de menor potencial genético serão então inseminadas com sémen de carne ou sémen de valor comercial reduzido. Os custos da inseminação com sémen sexado serão compensados pela beneficiação do resto do efectivo, com recurso a sémen mais barato. Os produtores tirarão o melhor partido do efectivo, produzindo fêmeas de substituição de elevado valor genético, descendentes de mães pré-seleccionadas e, ao mesmo tempo, melhoram a biossegurança da exploração, pelo facto de todas as novilhas de substituição serem produzidas na própria exploração.

Verifica-se também um ganho substancial em termos genéticos pela inseminação com SS das novilhas de substituição. Vários autores (Weigel, 2004; Khalajzadeh *et al.*, 2012) consideram que o SS pode acelerar o ganho genético nas explorações, pela selecção exclusiva das vacas com índices genéticos mais elevados, e este ganho é superior na utilização nas novilhas de substituição, uma vez que elas são supostamente as fêmeas da exploração, com mérito genético superior.

A utilização de sémen sexado também permite reduzir o número de partos distócicos. Estes têm um impacto relevante na economia de uma exploração, pelas quebras de produção, de fertilidade, mortalidade das vacas e novilhas, aumentando a taxa de refugo e custos em intervenção veterinária e com medicamentos (Dematawena & Berger, 1997).

Num efectivo de carne, o sexo preferencial é o masculino. Os machos ganham peso mais rapidamente, convertem o alimento mais eficientemente e são comercialmente mais valorizados. Os produtores de carne poderão usar o sémen sexado para aproveitar o valor superior dos machos relativamente às fêmeas, para a produção de carne (Hohenboken, 1999). Poderão também, utilizar o sémen sexado para produzir, apenas a proporção necessária de novilhas de substituição geneticamente superiores.

O sémen sexado deverá ter um enorme impacto na eficiência dos programas de testagem de reprodutores. Por um lado, pelo aumento de descendentes machos de vacas de elite, a serem avaliados nos programas de testagem de reprodutores, e por outro, acelerando esse processo de testagem, através da obtenção mais rápida de filhas dos touros em testagem. Para que o valor estimado do potencial genético de um touro seja considerado com uma fiabilidade aceitável, é necessário que pelo menos 50 filhas completem uma primeira lactação.

Em programas de Ovulação Múltipla e Transferência de Embriões (OMTE), a produção de crias do sexo preferencial, ajudará a otimizar os respectivos programas. De igual modo, a determinação do sexo antes da concepção evitará a produção de embriões de sexo não desejado, diminuindo o custo efectivo da fertilização *in vitro* (Hohenboken, 1999).

Finalmente, o uso de sémen sexado evitará a extinção de determinadas espécies e raças, cujos machos e fêmeas não são suficientemente numerosos para a sua multiplicação, minimizando-se a consanguinidade.

No futuro, o sémen sexado vai ser cada vez mais utilizado conforme for evoluindo a sua fertilidade e quanto mais eficiente for o processo de triagem. Paralelamente há uma grande necessidade de existir uma maior variabilidade de oferta de reprodutores com SS disponível, de forma a garantir o ganho genético necessário e, de haver, paralelamente, uma redução do seu preço, de forma a intensificar-se a sua utilização nos programas de IA. Estratégias de inseminar o mais próximo possível da ovulação podem melhorar a fertilidade do SS (Saacke, 2008).

Desta forma, o sémen sexado poderá vir a fazer parte integrante dos sistemas comerciais de IA e TE, bem como da sincronização de cios que normalmente é incorporada nestas práticas reprodutivas.

11.1. Crias resultantes de SS

As crias resultantes de inseminações com sémen sexado aparentam não ser diferentes de crias resultantes de sémen não sexado, em termos de peso à nascença, mortalidade, ganho de peso médio e incidência de anormalidades (Seidel, 2003).

Healy *et al.* (2013), também demonstraram que o sémen sexado tem uma pureza aceitável e não detectaram anormalidades nas crias dele resultantes. Com exceção do efeito do sexo da cria na duração da gestação, o sémen sexado não atenua ou prolonga a duração da gestação, de acordo com Tubman *et al.* (2004).

Com base em diversos estudos, não se verificaram diferenças nas taxas de aborto ou de nados-mortos, com SS ou SNS (Tubman *et al.*, 2004; Seidel, 2007; DeJarnette *et al.*, 2009). Estes resultados implicam que apesar das preocupações legítimas do potencial dano provocado no ADN dos Spz durante todo o processo, o aborto não é uma consequência biológica e, assim, os danos sofridos são provavelmente mínimos.

Tubman *et al.* (2004) compararam vitelos obtidos através de SS por citometria de fluxo com o marcador Hoechst 33342, com vitelos nascidos de SNS, em termos de duração da gestação, peso à nascença, facilidade de parto, vigor à nascença, ganho de peso médio, taxas de aborto e de morte pós-natal. Não foram encontradas diferenças entre as crias de ambos os grupos, para nenhuma das características estudadas. As diferenças observadas relacionaram-se com o sexo das crias, em termos de duração da gestação, peso à nascença, facilidade de parto, ganho de peso médio. As crias de sexo masculino apresentaram, como seria de esperar, uma maior duração da gestação, um peso superior à nascença, uma menor facilidade de parto e um ganho de peso médio superior (Holland & Odde, 1992).

IV. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Introdução

A avaliação e melhoria da eficácia reprodutiva de uma exploração leiteira implicam o estabelecimento de objectivos e a implementação de medidas para os atingir e para posteriormente se manter esse estatuto.

Para se obter um IP de 365 dias, o lapso temporal entre o parto e a concepção não deve ser superior a 80-85 dias (Costa *et al*, 2011). Consequentemente, para se atingir o objectivo de uma cria por ano, a involução uterina e a inactividade ovárica devem estar resolvidas antes daquele período de tempo (Gordon, 1996). Devem ser considerados também como objectivos, os valores de outros índices reprodutivos, nomeadamente: intervalo entre parto e primeira inseminação de 65 dias, IPC inferior a 100 dias, idade ao primeiro parto de 24 meses, TG à 1ª IA de 60%, IAC de 1,5 a 1,7 e o índice de refugo global inferior a 25%.

A fertilidade das vacas leiteiras pode ser influenciada por um conjunto de factores, nomeadamente, aumento da produção de leite, genética, nutrição, doenças reprodutivas/infecciosas, causas ambientais e práticas de manejo (Veerkamp & Beerda, 2007). Desta forma, importa analisar a performance reprodutiva estabelecendo relações de causa/efeito e aplicando as medidas correctivas adequadas.

A detecção do estro constitui a maior limitação para se conseguir uma gestação (Barr, 1975). Nos últimos anos, os programas de sincronização de ovulações têm permitido melhorias no controlo da reprodução pela utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e na manipulação do intervalo entre partos em fêmeas cíclicas e anéstricas.

Por outro lado, a utilização da ultrassonografia no exame reprodutivo de fêmeas bovinas abriu novos caminhos no conhecimento de alguns mecanismos íntimos da fertilidade. A visualização das estruturas ováricas permite um melhor reconhecimento da dinâmica folicular e do dia do ciclo éstrico, o diagnóstico de estruturas anormais, detecção de infecções uterinas, e por tudo isso, permite uma actuação mais exacta e, uma mais objectiva tomada de decisões. Além disso, o exame ecográfico permite o diagnóstico de gestação precoce aos 28 dias e o consequente acompanhamento da gestação, com detecção de morte embrio-fetal, sexagem do feto, diagnóstico de gestações gemelares. Permite por outro lado, a detecção precoce das fêmeas não gestantes para imediata ressincronização, de forma a atenuar o período em que as mesmas se encontram vazias.

Durante muito tempo, na ilha Terceira, verificou-se um investimento muito elevado em sêmen de superior mérito genético, mas pouca abertura para investimento no exame ginecológico da fêmea após o parto, e no diagnóstico de gestação após a inseminação. Inclusivamente, verifica-se que alguns dos trabalhos publicados referem que se considerava gestantes as fêmeas que não exibiam cio, 90 dias após a IA (Pavani *et al.*, 2015). Os médicos-veterinários estavam então, muito vocacionados para a clínica apesar de tentarem dar início às rotinas de um controlo reprodutivo regular, nas explorações. Nos últimos anos, esta realidade alterou-se, devido a um grande trabalho de sensibilização junto dos produtores e verificou-se um crescimento significativo no investimento em apoio veterinário especializado nessa área.

Foi incluída como rotina a utilização do ecógrafo em algumas explorações leiteiras para avaliação da involução uterina, diagnóstico de doenças, avaliação de ciclicidade e diagnóstico de gestação precoce. É notória a evolução das explorações em termos de melhorias reprodutivas, mas também no reconhecimento da importância deste acompanhamento reprodutivo. As visitas às explorações são efectuadas em função da dimensão das mesmas e, em média, de 15 em 15 dias, adicionalmente com o acompanhamento nos registos dos animais.

No presente trabalho, pretendeu-se implementar uma série de rotinas de controlo reprodutivo regular numa exploração leiteira da ilha Terceira, com o objectivo de melhorar alguns índices reprodutivos. Existiam várias questões que necessitavam de resposta e várias situações que tinham de ser corrigidas. O IP da exploração em análise era superior a 460 dias, o IP-1ª IA era superior a 115 dias; muitas vacas eram inseminadas uma 2ª vez, passados 60 dias após a 1ª IA; o produtor questionava se existiriam mortes embrio-fetais ou se o retorno ao cio não era observado; se a má detecção de cio seria o principal problema desta exploração; se a técnica de IA não seria executada adequadamente; se as vacas teriam muitas endometrites não detectadas.

Esta exploração tinha efectivamente um grande problema de eficiência de detecção de cios, facto que já era assumido pelo proprietário. Os trabalhadores observavam os animais nos períodos em que os iam levar e trazer da pastagem, mas na maior parte das vezes, não os observavam com rigor. Eram efectuados diagnósticos de gestação por palpação transrectal aos 50-60 dias após a IA, de forma que não era claro se os animais não tinham ficado gestantes ou se tinha ocorrido morte embrio-fetal. No pós-parto, realizava-se por rotina o controlo de temperaturas, a detecção e tratamento das vacas com infecção e temperatura elevada, o tratamento das vacas com retenção placentária e a administração de cálcio por via endovenosa no dia do parto, em todas as multíparas. As novilhas eram submetidas a protocolos de

sincronização de ovulação, com dupla administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, com um intervalo de 11 dias, e depois de inseminadas eram colocadas na pastagem, aos 21 dias pós-IA, com um reprodutor, para o caso de não terem ficado gestantes. Os registos de tratamentos, inseminações e diagnósticos estavam actualizados, mas não eram trabalhados para fins de avaliação de parâmetros reprodutivos. O ecógrafo não era utilizado na rotina reprodutiva da exploração, e uma vez que o diagnóstico de gestação era tardio, verificava-se um atraso na reutilização das fêmeas vazias em tempo útil, com consequente alongamento do IP.

O desafio passou por: avaliar todas as vacas após o parto com recurso ao ecógrafo, mantendo o controlo de temperaturas e os tratamentos nas vacas com retenção e com infecção, avaliar a involução uterina aos 30 dias pós-parto e a ciclicidade a partir dos 50 dias; depois da inseminação, realizar um diagnóstico de gestação precoce, aos 28 dias e, reconfirmar a gestação aos 70 dias e imediatamente antes do período de secagem; com o objectivo de reduzir o IP e o IP-1ªIA, ao mesmo tempo que se reforçava a observação do cio, passou-se a realizar diferentes protocolos de sincronização que consistiram: na administração de um análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2 mL de Veteglan, Calier Portugal, S.A., Portugal) nas fêmeas que possuíam CL funcional e folículo de dimensão adequada (+ de 15mm) na superfície do ovário (grupo PG) e num protocolo do tipo Double-Ovsynch modificado (grupo 2OSy) que consistiu na execução de dois protocolos Ovsynch consecutivos com um intervalo entre aplicações de 7 dias e com a administração dupla $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2 mL de Veteglan) às 72h e 48h anteriores à IATF. As fêmeas não gestantes aos 28 dias após IA foram ressincronizadas com um protocolo Select-Synch modificado (grupo SSy).

Como o proprietário revelara pouca confiança na IATF, optou-se pela IA nas vacas observadas em cio, às 12 horas após os primeiros sinais de cio, com excepção do grupo 2OSy em que as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo.

Foi realizado um segundo ensaio com novilhas cujo objectivo foi o de comparar a TG na utilização de sémen sexado ou sémen convencional. A utilização do sémen sexado está a ficar cada vez mais popular nas explorações de leite porque, por um lado, permite a obtenção de fêmeas para garantir a reposição do efectivo e, por outro, permite inseminar parte do efectivo com sémen de toiros com aptidão cárnica, tirando partido do vigor híbrido em termos reprodutivos e produtivos. As novilhas foram inseminadas quando observadas em cio espontâneo ou sincronizadas com um análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2 mL de Veteglan). Também neste ensaio, recorreu-se ao uso da ecografia na avaliação ginecológica e sincronização, bem como no diagnóstico de gestação. As novilhas não gestantes foram ressincronizadas com um protocolo de Select-Synch modificado.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização da exploração (38° 41' 6'' N, 27° 11' 52'' W)

A exploração agro-pecuária do presente estudo tem um total de 170 vacas em lactação, com uma média de 8 500 litros/vaca aos 305 dias, 85 vitelas e 85 novilhas numa área total de 300 hectares. Actualmente, 41% das vacas são primíparas, de forma que a média actual é de 2,37 lactações e de 4,5 anos de idade.

Em relação ao manejo, as vitelas são criadas até aos 3 meses de idade em vitaleiro semi-fechado e depois são mantidas em pastagens, suplementadas na época de carência com concentrado. As novilhas são sujeitas a um “flushing” alimentar a partir dos 14 meses de idade, altura em que são submetidas a IA para que o parto ocorra entre os 24 e 30 meses. Cerca de 2 meses antes do parto, as novilhas são mantidas perto das vacas de leite sendo fornecida uma alimentação à base de erva e silagem. Quinze dias antes da data prevista para o parto de todas as fêmeas gestantes, é feita a transição para a alimentação das vacas leiteiras em lactação.

As vacas leiteiras são mantidas num sistema de semi-pastoreio, sendo alimentadas com recurso a pastagens naturais e suplementadas no parque de alimentação através de uma mistura equilibrada de “unifeed” com feno, silagem de erva, silagem de milho e concentrado (Figura 25). Esta exploração pertence ao grupo da Quinta dos Açores e todo o leite produzido tem como destino a venda de produtos de qualidade superior, nomeadamente leite fresco, iogurtes, gelados e queijos. Dessa forma existe um compromisso muito acentuado entre a qualidade da matéria-prima e o bem-estar animal. As vacas têm obrigatoriamente de se alimentar à base de pastagens naturais e o suplemento deve garantir o equilíbrio necessário para manter a gordura e proteína adequadas a estas produções.

A secagem das vacas é efectuada aos 7 meses de gestação sendo mantidas durante esse período, em pastoreio. Nesta altura, e para se prevenir a hipocalcemia no pós-parto, é importante regular a ingestão de Ca e P. A preparação para o parto é feita 15 dias antes da data prevista para o efeito, com introdução gradual da alimentação das vacas em produção e o parto ocorre no pasto, ao longo de todo o ano.

Apesar das fêmeas apresentarem um bom estado corporal e termos verificado a existência de poucas fêmeas em anestro, esta exploração apresentava no período anterior ao trabalho experimental um intervalo entre partos superior a 460 dias, um deficiente protocolo de detecção de cios, um intervalo parto-1ª IA superior a 115 dias, um IPC de 190 dias e uma taxa de refugo superior a 35%.

Como resultado da avaliação efectuada, de 15 em 15 dias, pelo médico-veterinário, concluiu-se que as vacas estavam cíclicas e que faziam cios que não eram

detectados pelos tratadores. No final dos tratamentos de sincronização, a base das caudas foi pintada de vermelho de forma a auxiliar na detecção dos cios (Figura 26).

As fêmeas com parto distócico eram imediatamente submetidas a tratamento com antibiótico (Naxcel, substância activa Ceftiofur, Laboratórios Pfizer, Lda., Portugal) e AINES (Rimadyl, Laboratórios Pfizer, Lda., Portugal), ocitoxina (Facilpart, Laboratórios Syva, s.a.u., Espanha) e cálcio, 500mL por via endovenosa (Hipracal, Arbuset, Portugal). Foi feito o controlo de temperaturas nos primeiros 10 dias após o parto e às fêmeas com temperatura superior a 39,5°C foi-lhes administrado um AINES (Rimadyl). Nos casos em que foi confirmada uma infecção uterina, administrou-se um antibiótico (Naxcel) e um análogo de PGF_{2α} (2 mL Veteglan).

Registou-se uma fraca resposta aos tratamentos de sincronização ou deficiente detecção de cios, sendo que menos de 40% das vacas foram observadas em cio após serem submetidas aos diferentes protocolos. Nos ensaios efectuados nesta exploração, a observação do cio foi reforçada e, no entanto, a resposta continuou a ser inferior a 40%.

No caso específico das novilhas obteve-se uma resposta aos tratamentos de sincronização superior a 50%, o que pode ser explicado pelo facto da observação destes animais ser reforçada pelo criador aumentando os períodos de observação dos animais e incluindo a observação no final da tarde, início da noite.



Figura 25. Vacas em pastoreio e suplementação com mistura de “unifeed”



Figura 26. Marcação de caudas após administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$

2.2. Caracterização do trabalho experimental e dimensão da amostra

O trabalho experimental incluiu um total de 193 fêmeas bovinas da raça Holstein Frísia, das quais 81 eram nulíparas (novilhas), 45 primíparas e 67 múltíparas. Foram eliminados 10 animais: 3 fêmeas em anestro, 2 fêmeas com quistos ováricos, 3 fêmeas que apresentavam uma CC inferior a 2,5 e por fim, 2 novilhas free-martin.

As fêmeas incluídas no estudo apresentavam uma CC entre 2,5 e 3 (escala de 1 a 5), encontravam-se cíclicas e sem doenças reprodutivas no momento da IA.

Nas vacas, considerou-se um período voluntário de espera de 65 dias após o parto e as novilhas foram submetidas à IA com idade igual ou superior a 14 meses.

Foram efectuados exames ginecológicos nas vacas por palpação transrectal e com recurso a ecógrafo aos 30 dias após o parto para verificação da involução uterina, aos 50-60 dias para avaliação da ciclicidade e depois dos 65 dias pp, em relação com o tratamento de sincronização de ovulação.

Nas novilhas, foram efectuados exames ginecológicos por palpação transrectal e com recurso a ecógrafo antes do tratamento de sincronização e da IA.

Os animais foram inseminados de forma tradicional ocorrendo a intervenção, 12 horas após a observação do cio. As fêmeas submetidas ao protocolo de Double-Ovsynch foram inseminadas em tempo fixo, às 72h após a 1ª administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

O diagnóstico de gestação foi realizado entre os 28 e os 30 dias após a IA através de ecografia com recurso a um ecógrafo Easi-Scan (BCF Technology, Estados Unidos da América) equipado com uma sonda linear transrectal de 5 Megahertz (MHz) de frequência. A reconfirmação do diagnóstico de gestação foi efectuada por palpação transrectal e ecógrafo aos 70 dias após a IA para eventual registo de ME ou MF.

No Ensaio I (1ª IA), foram inseminadas 112 fêmeas, das quais 45 eram primíparas e 67 multíparas. As fêmeas foram divididas em 3 grupos: Grupo Controlo (n=39), que não foram sujeitas a qualquer protocolo e foram inseminadas depois de observadas em cio espontâneo; Grupo PG (n=39), fêmeas a quem foi administrado um análogo de PGF_{2α} (2 mL de Veteglan) e que possuíam CL funcional e folículo com mais de 15mm na superfície do ovário (Figura 27); Grupo 2OSy (n=34) que envolveu um protocolo do tipo Double-Ovsynch modificado (Figura 28) que resultou em dois protocolos Ovsynch consecutivos com um intervalo entre aplicações de 7 dias e com a administração de dupla PGF_{2α} (2 mL de Veteglan), às 72h e 48h anteriores à IATF.

Neste ensaio, foram ainda re-inseminadas 41 fêmeas, considerando um 4º grupo (Grupo SSy, n=34) com fêmeas resincronizadas (2ª IA) com um protocolo Select-Synch modificado (Figura 29) e um grupo que fez cio espontâneo antes do diagnóstico de gestação (Grupo CE, n=7). O protocolo Select-Synch consistiu na administração de um análogo de GnRH (2 mL de Acegon, Laboratórios Syva s.a.u., Espanha) após o diagnóstico de não gestante e, sete dias depois, foi-lhes administrado um análogo de PGF_{2α} (2 mL de Veteglan).

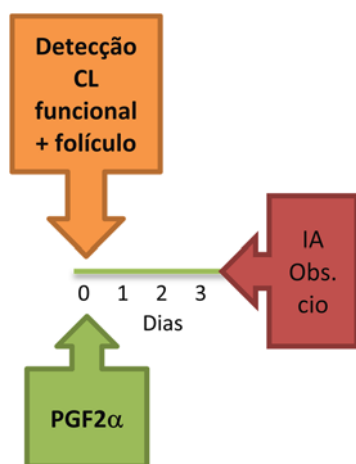


Figura 27. Esquema representativo do protocolo com administração de análogo de PGF_{2α} (Grupo PG)

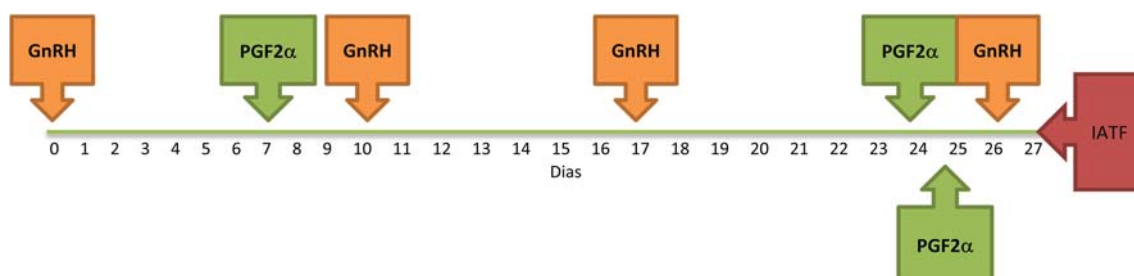


Figura 28. Esquema representativo do protocolo utilizado no ensaio do tipo Double-Ovsynch modificado (Grupo 2OSy)

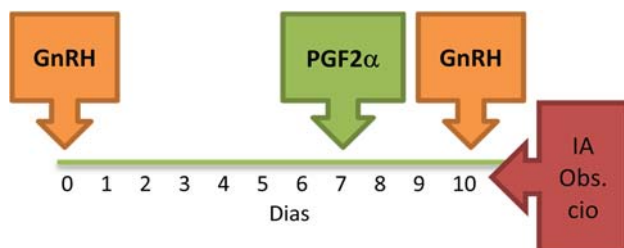


Figura 29. Esquema representativo do protocolo Select-Synch, utilizado na ressincronização das fêmeas (Grupo SSy)

No Ensaio II, foram inseminadas 81 novilhas da raça Holstein Frísia com idade igual ou superior a 14 meses. As fêmeas observadas em cio espontâneo ou sincronizadas com um análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2 mL de Veteglan), foram inseminadas 12 horas após a observação do cio. As novilhas não gestantes foram ressincronizadas com um protocolo de Select-Synch modificado e reinseminaram-se 13 novilhas. Este protocolo consistiu na administração de um análogo de GnRH (2 mL de Acegon) após o diagnóstico de não gestante e sete dias depois administrou-se um análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2 mL de Veteglan). Algumas novilhas fizeram cio espontâneo antes do diagnóstico de gestação ($n=11$) e foram inseminadas pela 2ª vez. As novilhas foram inseminadas com sêmen sexado (grupo SS) do touro Zelgadis ($n=44$) e com sêmen convencional ($n=37$) dos touros Bradnick ($n=12$), Man-O-Man II ($n=23$) e Mogul ($n=2$). As novilhas inseminadas com SNS foram re-inseminadas com SNS ($n=8$) e o mesmo sucedendo para as novilhas inseminadas com SS ($n=16$).

Os dados foram recolhidos entre Dezembro de 2014 e Março de 2016.

2.3. Análise estatística

O efeito dos diferentes protocolos de sincronização na TG e o efeito do tipo de sêmen na TG foi avaliado pelo Teste χ Quadrado, para um nível de significância $P < 0,05$ com auxílio do programa “IBM SPSS Statistics”.

O efeito dos diferentes protocolos de sincronização no IP-1ªIA e IPC foi avaliado através de um teste ANOVA, para um nível de significância $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

Considerando os resultados da exploração para alguns índices reprodutivos em 2014, verifica-se que em 2015, após a introdução da ecografia reprodutiva e do programa reprodutivo de acompanhamento, registaram-se melhorias em alguns índices reprodutivos. Ainda assim, sabe-se que os actuais resultados estão aquém dos resultados economicamente desejáveis, pelo que outras estratégias terão de ser implementadas. O IPC é muito elevado porque a taxa de submissão à IA é baixa, apesar da ciclicidade das fêmeas ser normal no final do período voluntário de espera (65 dias). Possivelmente a exploração terá de reduzir o PVE de forma a atingir o objectivo de IP-1ªIA de ≤ 65 dias. A taxa de refugo é muito elevada e poderá mascarar os outros índices reprodutivos. A fraca detecção de cio continua a ser um dos principais problemas da exploração, de forma que é necessário encontrar alternativas que possam melhorar a taxa de submissão à IA.

Tabela 3. Índices reprodutivos da exploração leiteira, comparação de 2014 e 2015.

ÍNDICES REPRODUTIVOS	2014	2015	OBJECTIVOS
Nº vacas em lactação	170	170	
Nº médio de lactações	2,45	2,37	
IP-1ª IA	115 dias	105 dias	≤ 65 dias
IPC	190 dias	172 dias	≤ 100 dias
IP	460 dias	448 dias	365 dias
IAC	2,2	1,75	1,5 a 1,7%
% vacas com IP>400 dias	70%	66%	
Taxa de refugo	36%	25%	$\leq 25\%$
Idade ao parto das primíparas	26-30	24-30	24

Analisando os resultados referentes ao Ensaio I (Tabelas 4 e 5) verificamos que a taxa de gestação do GC encontra-se dentro de valores aceitáveis (59%), sendo que o o IP-1ªIA é superior ao desejado (110 dias).

Através de uma análise isolada da taxa de gestação poderíamos ter uma falsa ideia de eficiência no Grupo Controlo relativamente aos outros. No entanto, o IP-1ªIA é numericamente superior, embora não existam diferenças significativas entre os grupos, o que implica perdas económicas para a exploração, porque consequentemente vai existir também aumento do IPC global da exploração. No GC, ganhou-se em taxa de gestação, redução de custos com sémen e fármacos, mas perdeu-se com o alongamento do intervalo entre partos.

No Grupo PG esperar-se-ia uma taxa de gestação superior uma vez que existe uma janela temporal definida para a exibição dos sinais de cio, pelo que a eficiência da detecção dos mesmos deveria ter sido superior e com isso os resultados após a IA. Porém, as fêmeas que não evidenciaram sinais específicos de cio (monta), mas que apresentaram ausência de marcação na base da cauda, foram inseminadas por volta das 72 horas após a PGF_{2α}, facto que pode ter tido alguma influência nos resultados obtidos, pois o esbatimento da marcação pode ter sido resultado da chuva ou de falsas montas.

O intervalo de tempo entre a injeção da PGF_{2α} e o desencadear dos sinais de cio varia entre animais e está dependente do CL funcional e do tamanho do folículo, verificando-se uma discrepância de 2 a 7 dias após a injeção. As novilhas respondem melhor e mais rapidamente do que as vacas, normalmente exibindo cio a partir do 2º dia. Por isso, a detecção dos cios deveria ter sido prolongada até ao 7º dia, para que a taxa de submissão à IA pudesse ser aceitável.

Neste Grupo PG, o intervalo médio parto-1ª IA foi de 96 dias o que revela alguma eficiência económica dentro do grupo comparativamente ao grupo controlo, apesar de se encontrar, mesmo assim, acima do intervalo desejado.

Relativamente ao Grupo 2OSy, este revelou uma taxa de gestação inferior aos restantes grupos, com diferença significativa ($P < 0,05$) com o GC, provavelmente por a IA ter ocorrido precocemente relativamente ao diâmetro do folículo pré-ovulatório. No entanto, o mesmo protocolo utilizado em outras explorações, no Continente, registou taxas de gestação de 53% (resultados apresentados no I Encontro Reprodutivo da Ilha Terceira). Estudos recentes (Ayres *et al.*, 2013) reportaram um aumento da taxa de gestação para este protocolo devido a uma melhor sincronização da ovulação, associada a dois factores: disponibilidade de um folículo dominante que ovulará após a terceira administração de GnRH e um aumento dos níveis de progesterona, anterior à administração de PGF_{2α}. Teria sido importante para o ensaio o doseamento de P4 em momentos chave dos vários grupos em análise associando-se exame ecográfico dos ovários para avaliação das dimensões dos folículos dominantes. Deste modo, poderíamos saber que fêmeas do grupo 2OSy possuíam no final do tratamento um folículo em condições de ovular e assim decidir a oportunidade da IA. Neste grupo obteve-se um IP-1ªIA de 96 dias, o que significa que as fêmeas devem iniciar este programa mais cedo após o parto de forma a conseguirmos reduzir este período de tempo, considerando que este protocolo leva 28 dias a ser executado.

Tabela 4. Resultados do Ensaio I: taxas de gestação para vacas submetidas à 1ª inseminação considerando 2 grupos de tratamento, Grupo PG e Grupo 2OSy e um Grupo Controlo.

Protocolo	%TG	IP-1ª IA
GC	59% (23/39) ^a	109,82 ± 39,11
PG	46% (18/39)	95,97 ± 38,68
2OSy	35% (12/34) ^b	96,44 ± 20,72
Total 1ª IA	47% (53/112)	100,94 ± 38,72

Nota: os resultados representam a % de fêmeas gestantes à 1ª IA. O IP-1ªIA está representado em cada grupo com a média ± erro padrão (ep). Os valores seguidos de letras (a, b) são estatisticamente diferentes (P<0,05)

Tabela 5. Resultados do Ensaio I: taxas de gestação em vacas ressinclonizadas e re-inseminadas (Grupo SSy).

Protocolo	%TG	IP-2ª IA
CE	57% (4/7)	116,57 ± 34,93
SSy	59% (20/34)	151,18 ± 36,58
Total 2ª IA	59% (24/41)	145,27 ± 36,58

Nota: algumas vacas revelaram cio espontâneo e foram re-inseminadas (Grupo CE). Os resultados representam a % de fêmeas gestantes à 2ª IA. O IP-2ªIA está representado em cada grupo com a média ± erro padrão (ep)

Das 112 fêmeas do Ensaio I, 53 ficaram gestantes à 1ª IA, das restantes 59 não gestantes, 7 foram re-inseminadas ao retorno ao cio e 34 foram ressinclonizadas com um programa de Select-Synch (SSy), tendo no total ficado gestantes 24 fêmeas (59%), dentro dos valores normais e sem diferença entre os grupos (Tabela 5). Das 59 fêmeas não gestantes à 1ª IA, verificou-se que 18 fêmeas não foram re-inseminadas por ausência de resposta ao protocolo SSy (31% não responderam).

Uma vez que o protocolo de detecção de cios não considerou um período de observação nocturno, poderá ser esta, uma das possíveis explicações para a baixa taxa de submissão no grupo SSy, pois é sabido que mais de 65% das vacas exibem comportamento de cio durante a noite.

Apesar de se ter obtido uma boa taxa de gestação, verifica-se um alongamento entre o intervalo parto-2ª IA que penaliza o resultado, por alongamento do IP.

Considerando que a exploração tem bons resultados em termos de taxas de gestação sobre cios detectados, impõe-se a necessidade da implementação de outras estratégias que optimizem a eficácia da detecção de cios, como por exemplo a instalação de podómetros. O uso deste tipo de dispositivos permite registar um aumento de actividade locomotora, porque a vaca em cio está normalmente menos

tempo parada, reduzindo no tempo destinado a comer, a ruminar e descansar (Ribeiro, 2015).

No Ensaio II, foram inseminadas nulíparas (novilhas) com 2 tipos diferentes de sémen, sémen convencional não sexado e sémen sexado. As novilhas foram submetidas a um programa de sincronização com administração de PGF_{2α} e comparadas as taxas de gestação com o Grupo Controlo.

Não se verificaram diferenças significativas entre as taxas de gestação das novilhas dos grupos PG e GC (tabela 6).

Tabela 6. Resultados do Ensaio II: taxas de gestação em nulíparas (novilhas) submetidas à 1ª IA, após um tratamento com PGF_{2α} (Grupo PG) e um Grupo Controlo (GC).

Protocolo	%TG	Idade-1ª IA
GC	59% (25/42)	1,5 ± 0,17
PG	51% (20/39)	1,6 ± 0,17
Total 1ª IA	56% (45/81)	1,5 ± 0,17

Nota: os resultados representam a % de fêmeas gestantes à 1ª IA. Nesta Tabela está representada a idade média ± erro padrão (ep) das novilhas à 1ª IA

Tabela 7. Resultados do Ensaio II: taxas de gestação em nulíparas (novilhas) ressincronizadas e re-inseminadas (Grupo SSy). Alguns animais entraram em cio espontâneo e foram inseminadas (Grupo CE).

Protocolo	%TG	Idade-2ª IA
CE	82% (9/11)	1,7 ± 0,16
SSy	62% (8/13)	1,6 ± 0,18
Total 2ª IA	71% (17/24)	1,7 ± 0,17

Nota: os resultados representam a % de fêmeas gestantes à 2ª IA. Na tabela está representada a idade média ± erro padrão (ep) das novilhas à 2ª IA

Das 81 novilhas inseminadas, 45 ficaram gestantes à 1ª IA e 36 ficaram vazias. Destas 36 vazias, apenas 24 foram detectadas em cio e re-inseminadas (Tabela 7), sendo que 12 fêmeas não responderam ao tratamento SSy e, por isso, não foram re-inseminadas (33%). Uma vez mais, a eficiência de detecção de cios foi baixa, existindo a necessidade em a melhorar.

Os resultados da taxa de gestação à 1ª IA podem ser considerados aceitáveis dado que os grupos em análise foram beneficiados com recurso a sémen convencional e sexado.

Em termos globais, o presente Ensaio (Tabela 8) revelou diferenças nas taxas de gestação com SNS, sendo estas superiores às obtidas com recurso a SS, apesar das diferenças não terem sido significativas.

Estas diferenças têm sido explicadas por diversos estudos (Seidel & Garner, 2002; Rath *et al.*, 2003; Seidel, 2012), tendo em consideração a diminuição da população espermática nas doses seminais de SS e os danos provocados pelo processo de sexagem do sémen. Porém, nas re-inseminações (Tabela 9), essa situação encontra-se invertida e possivelmente está relacionada com o factor fêmea porque não tendo ficado gestantes à 1ª IA com sémen convencional que possui uma população espermática muito superior ao SS, o défice de fertilidade demonstrado à 2ª IA também com o mesmo tipo de sémen, poderá dever-se a problemas inerentes à própria fêmea.

Tabela 8. Taxas de gestação à 1ª IA considerando a utilização de 2 tipos de sémen: sémen convencional (SNS) e sémen sexado (SS).

Nº IA	Sémen	%TG
1	SNS	65% (24/37)
1	SS	48% (21/44)
1	Total	56% (45/81)

Nota: os resultados representam a % de fêmeas que ficaram gestantes

Tabela 9. Taxas de gestação à 2ª IA considerando a utilização de 2 tipos de sémen: sémen convencional (SNS) e sémen sexado (SS).

Nº IA	Sémen	%TG
2	SNS	50% (4/8)
2	SS	81% (13/16)
2	Total	71% (17/24)

Nota: os resultados representam a % de fêmeas que ficaram gestantes

Analisando as novilhas inseminadas com SS e SNS separadamente verifica-se que as taxas de gestação são semelhantes entre o grupo PG e o grupo GC (Tabela 10).

Tabela 10. Taxas de gestação obtidas considerando separadamente o tipo de sêmen utilizado (SNS ou SS) e os protocolos de sincronização adoptados.

Protocolos	% TG	Protocolos	% TG
SNS-GC	68% (17/25)	SS-GC	47% (8/17)
SNS-PG	58% (7/12)	SS-PG	48% (13/27)

Nota: os resultados representam a % de fêmeas que ficaram gestantes; não se avaliou estatisticamente a interacção entre os 4 grupos

Por último, o ecógrafo revelou grande importância no controlo reprodutivo da exploração, porque permitiu resolver perturbações do puerpério o mais precocemente possível (Tabela 11). Registaram-se melhorias significativas na detecção de anomalias do puerpério, na selecção de fêmeas para início de actividade reprodutiva, no diagnóstico de doença uterina e consequente intervenção terapêutica e ainda, na monitorização dos resultados, na precocidade do diagnóstico de gestação e avaliação da viabilidade embrio-fetal. Na reavaliação por ecografia aos 60-70 dias foram detectadas 5 morte embrio-fetais (6%).

Estes resultados sugerem que, globalmente, o alongamento do IP se deveu à falta de eficiência na detecção deaios, excluindo-se a hipótese de haver uma anormal componente mortalidade embrio-fetal, envolvida no processo.

Tabela 11. Intervenções realizadas em 145 fêmeas paridas com recurso à ultrassonografia em termos de detecção de problemas no puerpério e resolução dos mesmos.

Área de intervenção	Actividades	Nº de casos
Reprodução e Obstetrícia	Quistos ováricos	6
	Metrites	14
	Endometrites	12
	Anestro	3
	Piometra	1

Nota: os resultados revelaram 4% quistos ováricos, 10% de metrites, 8% de endometrites, 2% anestro e 0,7% de piometra.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram grande influência do recurso à ultrassonografia, de forma que as fêmeas que o integraram pudessem estar em idênticas condições de potencial reprodutivo.

A detecção precoce de fêmeas não gestantes permitiu a sua beneficiação em tempo oportuno evitando maiores alongamentos do IP.

V. CONCLUSÃO GERAL

Os índices reprodutivos em análise melhoraram relativamente aos registados ao ano anterior ao início do trabalho experimental, apesar de ainda não se terem atingido os valores desejáveis.

A introdução da ecografia na rotina da exploração permitiu otimizar a avaliação das fêmeas de forma a detectar doenças em tempo útil, resolvê-las e deste modo beneficiar apenas as fêmeas com potencial reprodutivo adequado. Por outro lado, permitiu ainda o diagnóstico precoce de gestação e avaliação da viabilidade embrionária e sobretudo, a beneficiação também precoce das fêmeas não gestantes. A ecografia também permitiu eliminar a ideia de que poderia ser a morte embrio-fetal a principal responsável pelo agravamento do intervalo entre partos, até então registado.

Relativamente aos protocolos de sincronização de ovulações utilizados no presente trabalho, os resultados obtidos não foram excepcionais, tendo em consideração os custos em fármacos, o consumo de tempo e de mão-de-obra e ainda, fortemente influenciados pela baixa eficiência de detecção de cios.

Nestas circunstâncias, parece impor-se para a exploração leiteira em análise, maiores investimentos em programas de detecção de cios que permitam uma maior taxa de submissão à IA quer em novilhas, quer em vacas.

No futuro pretende-se investir em podómetros para melhorar a taxa de submissão à IA e manter a utilização da ecografia reprodutiva como rotina, para que venham a ser obtidos melhores valores dos índices reprodutivos agora analisados.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abbitt, B., Ball, L., Kitto, G. P., Sitzman, C. G., Wilgenburg, B., Raiw, L. W., Seidel, G. E., (1978). Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 173, pp. 973-977
- Allrich, R. D., (1994). Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp.2738-2744
- Amory, J. R., Kloosterman, P., Barker, Z. E., Wright, J. L., Blowey, R. W., Green, L. E. (2006). Risk factors for reduced locomotion in dairy cattle on nineteen farms in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp. 1509-1515
- Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E., Dahlbom, M., (2004). Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, vol. 61, pp.1583-1588
- Ayres, H., Ferreira, R. M., Cunha, A. P., Araújo, R. R., Wiltbank, M. C., (2013). Double-Ovsynch in highproducing dairy cows: effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology*, vol. 79, pp.159-164
- Azevedo, C., Canada, N., Simões, J. (2014). O protocolo hormonal Ovsynch e suas modificações em vacas leiteiras de alta produção: uma revisão. *Arch. Zootec.* vol. 63 (244): pp. 173-187
- Azevedo, C., Maia, I., Canada, N., Simões, J. (2014). Comparison of fertility, regular returns to estrus and calving interval between Ovsynch and CO-synch + CIDR protocols in dairy cows. *Theriogenology*, vol. 82, pp.910-914
- Bach, A., Dinare, M., Devant, M., Carre, X. (2007). Associations between lameness and production, feeding and milking attendance of Holstein cows milked with an automatic milking system. *Journal of Dairy Research*, vol. 74, pp. 40-46
- Ball, L., Carroll, E. J., (1963). Induction of fetal death in cattle by manual rupture of the amniotic vesicle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 142, pp. 373-374

Ball, P. H., Peters, A. R., (2004). Reproductive management. In P. H. Ball, & A. R. Peters, *Reproduction in Cattle*, Third Edition (pp.215-230). Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing

Barr, H. L. (1975). Influence of estrus detection on days open in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, vol. 58 (2), pp.246-247

Bartolome, J. A., Van Leeuwen, J. J. J., Thieme, M., Sa'filho, O. G., Melendez, P., Archbald, L. F. Thatcher, W. W. (2009). Synchronization and resynchronization of inseminations in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol. *Theriogenology*, vol. 72, pp.869-878

Beal, W. E. (1998). Current estrus synchronization and artificial insemination programs for cattle. *Journal Animal Science*, vol 76, pp.30-38

Bello, N. M., Steibel, J. P., Pursley, J. R., (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp.3413-3424

Bisinotto, R. S., Ribeiro, E. S., Santos, J. E. P., (2014). Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *The Animal Consortium*, pp.1-9

Blottner, S., Nehring, H., Torner, H., (1990). Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. *Theriogenology*, vol. 34, pp.619-628

Borchersen, S., Peacock, M., (2009). Danish A. I. field data with sexed semen. *Theriogenology*, vol. 71, pp.59-63

Bowell, V. A., Rennie, L. J., Tierney, G., Lawrence, A. B., Haskell, M. J. (2003). Relationships between building design, management system and dairy cow welfare. *Animal Welfare*, vol. 12, pp. 547-552

Breuer, K., Hemsworth, P. H., Barnett, J. L., Coleman, G. J. (2000). Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 66, pp. 273-288

Britt, J. H. (1975). Early postpartum breeding in dairy cows. A review. *Journal of Dairy Science*, vol. 58 (2), pp.266-271

Call, E. P., Stevenson, J. S. (1985). Current challenges in reproductive management. *Journal of Dairy Science*, vol. 68 (10), pp.2799-2805

Carrière, P. D., DesCôteaux, L., Durocher, J. (2005). Ultrasonography of the reproductive system of the cow. *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal St.-Hyacinthe, Québec, Canada: (CD-ROM audio-video-3D interactive learning environment and multilingual)*

Cerqueira, J. L., Araújo, J. P., Sorensen, J. T., Niza-Ribeiro, J. (2011). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 110 (557-580), pp. 5-19

Chagas e Silva, J. (2009). Transferência embrionária em bovinos leiteiros na Ilha Graciosa (Açores): programa experimental de transferência de embriões sexados e congelados da raça Holstein Frísia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 104 (569-572) 25-30

Chenault, J. R., Boucher, J. F., Dame, K. J., Meyer, J. A., Wood-Follis, S. L. (2003). Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp.2039-2049

Costa, A. N. L., Airton, A. A., Feitosa, J. V., (2011). Particularities of bovine artificial insemination. In *Artificial Insemination in Farm Animals* (pp.153-167). Rijeka, Croatia: InTech

Crowe, M. A. (2008). Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43 (suppl. 5), pp. 20-28

Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftsinger, M., Nebel, R. L., Saacke, R. G. (2001). Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp.2413-2418

Dechamps, P., Nicks, B., Canart, B., Gielen, M., Istasse, L. (1989). A note on resting behavior of cows before and after calving in two different housing systems. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 23, pp.99-105

DeJarnette, J. M., McCleary, C. R., Leach, M. A., Moreno, J. F., Nebel, R. L., Marshall, C. E., (2010). Effects of 2.1 and 3.5x10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp.4079-4085

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., Marshall, C. E., (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*, vol. 71, pp.49-58

DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., Marshall, C. E., Moreno, J. F., McCleary, C. R., Lenz, R. W., (2008). Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp.1778-1785

Dematawena, C. M. B., Berger, P. J., (1997). Effect of dystocia on yield, fertility and cow losses and an economic evaluation of dystocia scores for Holstein. *Journal of Dairy Science* vol. 80, pp.754-761

DesCôteaux, L., Buczinski, S. (2009). Examen échographique de l'appareil reproducteur et de la glande mammaire. In: Buczinski, S., DesCôteaux, L., editors. *Échographie des bovins*. Paris: Les Éditions du Point Vétérinaire, pp 109-119

DesCôteaux, L., Fetrow, J. (1998). Does it pay to use an ultrasound machine for early diagnosis in dairy cows? In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners*. Spokane (WA), pp172-174

DesCôteaux, L., Gnemmi, G., Colloton, J. (2010). *Practical atlas of ruminant and camelid reproduction ultrasonography*. Ames (IA): Wiley-Blackwell

Diskin M.G., Sreenan J.M. (1993). Heat synchronization in suckler cows. *Irish Farmer's Journal* vol. 45 (24), pp. 22

Domecq, J. J., Skidmore, A. L., Lloyd, J. W., Kaneene, J. B. (1997). Relationship between body condition scores and milk yield in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, pp. 101-112

Douthwaite, R., Dobson, H. (2000). Comparison of different methods of diagnosis of cystic ovarian disease in cattle and an assessments of its treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. *Veterinary Record*, vol. 147, pp. 355-359

Dunne L.D., Diskin M.G., Sreenan J.M. (2000). Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science* vol. 58, pp. 39-44

El-Zarkouny, S. Z., Cartmill, J. A., Hensley, B. A. (2004). Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *Journal of Dairy Science*, vol. 83 (4), pp.1024-1037

Ettema, J. F., Santos, J. E. P., (2004). Impact of Age at Calving on Lactation, Reproduction, Health, and Income in First-Parity Holsteins on Commercial Farms. *Journal of Dairy Science*. vol.87, pp.2730–2742

Extension, America's Research-based Learning Network, (2010). Methods for Diagnosis and Monitoring of Pregnancy in Dairy Cattle and their Implementation. Acedido a 9/06/2014. Disponível em: <http://www.extension.org/pages/11200/methods-for-diagnosis-and-monitoring-of-pregnancy-in-dairy-cattle-and-their-implementation#>. U5GSRPldWeg

Farin, P. W., Slenning, B. D., (2001). Managing reproductive efficiency in dairy herds. In Radostitis OM (Ed.) *Herd Health: Food Animal Production Medicine* 3º Ed, W.B. Saunders Company, pp.255-289

Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomsen, N. (1994). Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 77, pp. 2695-2703

Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelofs, R. M. G., van Hoorne, R. P., Moreno, J. F., Moreno, O., Merton, J. S., (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, vol. 71, pp.64-67

Galvão, K. N., Sá Filho, M. F., Santos, J. E. P., (2007). Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol.90, pp.4212-4218

Garner, D. L., Seidel Jr., G. E., (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, vol. 52, pp.1421-1433

Ginther, O. J. (1998). *Ultrasonic imaging and animal reproduction: cattle*. Wisconsin: Equi-services Publishing, pp. 134-143

Gordon, I. (1994). *Laboratory production of cattle embryos*. Biotechnology in Agriculture 11. CAB International.

Gordon, I. (2004). Artificial insemination. In I. Gordon (Ed.), *Reproductive Technologies in Farm Animals* (1st ed., pp.49-53). Wallingford: Cabi. Doi: 10.1079/9780851998626.0000

Gordon, I. (1996). Factors affecting fertility of the beef cow. In *Controlled Reproduction in Cattle & Buffaloes: controlled reproduction in farm animals series* (1 st ed., p. 9). New York – USA: CAB International

Grummer, R. R., (2007). Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. *Theriogenology*, vol. 1, 68 Suppl 1: pp.281-288

Healy, A. A., House, J. K., Thomson, P. C., (2013). Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, vol. 96, pp.1905-1914

Holland, M. D., Odde, K. G., (1992). Factors affecting calf birth-weight: a review. *Theriogenology*, vol. 38, pp.769-798

Hohenboken W.D. (1999). Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* vol. 52, pp. 1421-1433

http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG_Dairy-06.pdf

Johnson, L. A., (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, vol. 60, pp.93-107

Johnson, L. A., Flook, J. P., Hawk, H. W., (1989). Sex preselection in rabbits. Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biologie Reproduction* vol. 41, pp.199-203

Johnson, L. A., Flook, J. P., Look, M. V., Pinkel, D., (1987). Flow sorting of X and Y chromosome bearings spermatozoa into two populations. *Gamete Res.* Vol. 16, pp.203-212

Kastelic, J. P., Curran, S., Pierson, R. A., *et al* (1998). Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*, vol. 29, pp. 39-54

Keown, J.F., Kononoff, P. L., (2006). Putting a price on reproductive losses. *Dairy Cattle Reproduction Council Neb Guide* 2006

Keyserlingk, M. A. G., Olenick, D., Weary, D. M. (2008). Acute behavioral effects of regrouping dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 1011-1016

Khalajzadeh, S. Nejati-Javaremi, A., Yeganeh, H. M., (2012). Effect of widespread and limited use of sexed semen on genetic progress and reproductive performance of dairy cows. *Animal*, vol.6, pp.1398-1406

Kiracofe, G. H. (1980) Uterine involution: its role in regulating postpartum intervals. *Journal of Animal Science*, vol. 51, pp.16-28

Lamb, G. C., Cartmill, J. A. & Stevenson, J. S. (2004). Effectiveness of select synch (Gonadotropin-releasing hormone and Prostaglandin $F_{2\alpha}$) for synchronizing estrus in replacement beef heifers. *The professional Animal Scientist*, Vol. 20, pp. 27-33

Lamb, G. C., Dahlen, C. R., Larson, J. E., Marquezini, G., Stevenson, J. S. (2010). Control of the estrus cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *Journal of Animal Science*, Vol. 88 (13), pp. 181-192
producing animals: a review. *Animal Reproduction Science*, Vol. 109 (1-4), pp. 1-16

Lane, E. A., Austin, E. J., Crowe, M. A. (2008). Oestrus synchronization in cattle – current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food

Lucy, M. C., Billings, H. J., Butler, W. R., Ehnis, L. R., Fields, M. J., Kesler, D. J., Kinder, J. E., Mattos, R. C., Short, R. E., Thatcher, W. W., Wettermann, R. P., Yelich, J. V., Hafs, H. D. (2001). Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2alpha for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. *Journal of Animal Science*, Vol. 79, pp. 982-995

McDougall, S. 2010. Comparison of diagnostic approaches and a cost benefit analysis of different diagnosis approaches and treatments of anoestrous dairy cows. *New Zealand Veterinary Journal*, vol. 58, pp.81-89

McDougall, S., Rhodes, F. M., Compton, C. W. R., (2013). Evaluation of three synchrony programs for pasture-based dairy heifers. *Theriogenology*, vol. 79, pp.882-889

Meadows, C., (2005). Reproductive record analysis. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, vol. 21, pp.305-323

Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F., Thatcher, W. W., (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, pp.1646-1659

Moreira, F., Risco, C. A., Pires, M. F. A. (2000). Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*, vol. 83 (6), pp.1237-1247

Norman, H. D., Hutchison, J. L., Miller, R. H., (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, pp.3880-3890

O'Connor, M. L., (2007). Estrus Detection in Youngquist RS, Threlfall WR (Eds.). Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2º Ed, W.B. Saunders Company, pp.270-277

Parkinson, T., & Noakes, D. (2001). Veterinary control of herd fertility. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson, & G. C. England, Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, Eight Edition (pp. 511-556). London, United Kingdom: Saunders, Elsevier

Pavani, K., Carvalhais, I., Faheem, M., Chaveiro, A., Reis, F.V., Da Silva, F. (2015). Reproductive performance of holstein dairy cows grazing in dry-summer subtropical climatic conditions: Effect of heat stress and heat shock on meiotic competence and in vitro fertilization", Asian-Australasian Journal of Animal Sciences vol. 28, 3: pp. 334 – 342

Pereira, G. S. (2013). Estudo ultrassonográfico de alguns aspectos da dinâmica ovárica em vacas da raça Frísia Holstein sujeitas a vários protocolos de indução de ovulação. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa

Peter, A. T., Vos, P. M., Ambrose, D. J., (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. Theriogenology, vol. 71, pp.1333–1342

Plaizier, J. C. B., Lissemore, K. D., Kelton, D., King, G. J., (1998). Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. Journal of Dairy Science. vol. 81, pp.1848-1854

Plaizier, J. C., King, G. J., Dekkers, J. C., Lissemore, K., (1997). Estimation of economic values of indices for reproductive performance in dairy herds using computer simulation. Journal of Dairy Science, vol. 80(11), pp.2775–2783

Portaluppi, M. A., Stevenson, J. S., (2005). Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. Journal of Dairy Science, vol. 88, pp.914-921

Pursley, J. R., Fricke, P. M, Garverick, H. A. (2001). Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. In: Abstracts of Midwest ADSA-ASAS meeting, pp.63

Pursley, J. R., Mee, M. O., Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*, vol. 44 (4), pp.915-923

Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S. (1997). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, vol 80 (2), pp.295-300

Pursley, R. J., Silcox, R. W., Wiltbank, M. C. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol, 81 (8), pp. 2139-2144

Rath, D., Sieg, B., Leigh, J., Klinc, P., Besseling, M., Krüger, C., Wolken, A., Frenzel, A., Westermann, P., Probst, S., Grosfeld, R., Hadelers, K.G., Ehling, C. (2003). Current perspectives of sperm sorting in farm animals. 19th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Rostock (Allemagne), September 12-12, 125-128

Regula, G., Danuser, J., Spycher, B., Wechsler, B. (2004). Health and welfare of dairy cows in different husbandry systems in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 66, pp. 247-264

Reneau, J. K., Seykora, A. J., Heins, B. J., Emdres, M. I., Farnsworth, R. J., Bey, R. F. (2005). Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 227, pp. 1297-1301

Ribadu, A. Y., Ward, W. R., Dobson, H. (1994). Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Veterinary Record*, vol. 135, pp. 452-457

Ribeiro, A. (2015). *Controlo Reprodutivo em Bovinos. Edição Especial para a Bayer. Publicações Ciência e Vida, Lda.*

Ribeiro, E. S., Cerri, R. L. A., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Silvestre, F. T., Greco, L. F., Thatcher, W. W., Santos, J. E. P., (2011). Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *Journal of Dairy Science*, vol. 94, pp.4984-4996

Roche, J. F., (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, pp.282-296

Rodrigues, A. M., Guimarães, J., Oliveira, C., (2012). Rentabilidade das explorações leiteiras em Portugal - dados técnicos e económicos. Livro de Resumos, V Jornadas de Bovinicultura, IAAS-UTAD, Vila Real, 30-31 Março. pp. 109-129

Rushen, J. de Pasillé, A. M., Munksgaard, L. (1999). Fear of people by cows and effects on milk yield, behaviour and heart rate at milking. *Journal of Dairy Science*, vol 82, pp. 720-727

Saacke, R. G., (2008). Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology*, vol. 70, pp.479-484

Santos, J. E. P., Rutigliano, H. M., Sá Filho, M. F., (2009). Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, vol. 110, pp.207–221

Santos, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A., Galvão, K. N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, vol. 82–83, pp. 513–535

Santos, J. P., (2008). Impact of nutrition on dairy cattle reproduction. High Plains Dairy Conference, (pp.25-36). Albuquerque, NM

Schreiner, D. A., Ruegg, P. L. (2003). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, vol. 86, pp. 3460-3465

Seidel Jr., G. E., (2007). Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, vol. 68, pp.443-446

Seidel Jr., G. E., Schenk, J. L., (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, vol. 105, pp.129-138

Seidel, G. E. Jr., Allen, C. H., Johnson, L. A., Holland, M. D., Brink, Z., Welch, G. R. Graham, J. K., Cattell, M. B., (1997). Uterine insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* vol. 48, pp.1255-1264

Seidel, G. E. Jr., Garner, D. L., (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* vol. 124, pp.733-743

Seidel, G. E. Jr., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., Cran, D. G., (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* vol. 52, pp.1407-1420

Seidel, G. E., (2003). Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* vol. 59, pp.585-598

Seidel, G. E., (2012). Sexing mammalian sperm – where do we go from here? *Journal of Reproduction and Development*, vol. 58, pp.505-509

Sharpe, J. C., Evans, K. M., (2009). Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*, vol. 71, pp.4-10

Sheldon, M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. *et al* (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, vol. 65 (8), pp. 1516-1530

Smith, R. F., Oultram, J., Dobson, H. (2014). Herd monitoring to optimise fertility in the dairy cow: making the most of herd records, metabolic profiling and ultrasonography (research into practice). *The Animal Consortium* 2014, pp. 1-14

Souza, A. H., Ayres, H., Ferreira, R. M., Wiltbank, M. C., (2008). A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, vol. 70, pp.208-215

Sreenan J.M., Diskin M.G. (1992). *Breeding the Dairy Herd*. Teagasc Publication, Dublin, 112

Stevenson, J. S. (2005). Breeding Strategies to Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds. *Veterinary Clinics Food Animal Practice* vol. 21, pp.349-365

Stevenson, J. S., Cartmill, J. A., Hensley, B. A., El-Zarkouny, S. Z. (2003). Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. *Theriogenology*, vol. 60, pp.475-483

Stevenson, J. S., Pursley, J. R., Garverick, H. A., Fricke, P. M., Kesler, D. J., Ottobre, J. S., Wiltbank, M. C., (2006). Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, pp.2567-2578

Suh, T. K., Schenk, J. L., (2003). Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology* 59, (in press) (abstrat)

Tenhagen, B. A., Surholt, R., Wittke, M., Vigel, C., Drillich, M., Heuwieser, W. (2004). Use of Ovsynch in dairy herds – differences between primiparous and multiparous cows. *Animal Reproduction Science*, Vol. 81 (1-2), pp. 1-11

Thibault, C. et Levasser, M. C. (1991). La reproduction chez les mammifères et l'homme. Inra – France

Thomsen, P. T., Munksgaard, L., Togersen, F. A. (2008). Evaluation of a lameness scoring system for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 119-126

Tubman, L. M., Brink, Z., Suh, T. K., Seidel, G. E. Jr., (2004). Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Animal Science*, vol. 82, pp.1029-1036

Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M. A., Vazquez, J. L. (2003). Birth of piglets after deep intrauterine insemination with cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* vol. 59, pp.1605-1614

Veerkamp, R. F., Beerda, P., (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, vol. 1, (68 Suppl) 1, pp.266-273.

Veissier, I., Beaumont, C., Lévy, F. (2007). Les recherches sur le bien-être animal: buts, méthodologie et finalité. *INRA – Productions Animales*, vol. 20 (1), pp. 3-10

Ward, W. R., Hughes, J. W., Faull, W. B., Cripps, P. J., Sutherland, J. P., Suthers, J. E. (2002). Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Veterinary Record*, vol. 151, pp. 199-206

Webster, A. J. F. (2005). The assessment and implementation of animal welfare: theory into practice. *Rev. Sci Tech Off Int Epiz*, vol. 24 (2), pp. 723-734

Weigel, K. A., (2004). Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *Journal of Dairy Science*, vol. 87 (Suppl. 13), pp.120-130.

Wiltbank, M. C., Pursley, J. R. (2014). The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, vol. 81, pp. 170-185

Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. (2000). Impaired reduction in heat-stress cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, vol. 60, pp.535-547.

Yoshida, C., Nakao, T., (2005). Some characteristics of primary and secondary oestrous signs in high-production dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 40, pp.150-155.

Young, A., (2002). Troubleshooting Reproductive Records to Determine Potential Problems. Utah State University Extension, Utah, AG/Dairy-06. Acedido a 23/06/2014. Disponível em: http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG_Dairy-06.pdf

Zulu, V. C., Nakao, T., Yamada, K., Moriyoshi, M., Nakada, K., Sawamukai, Y. (2000). Clinical Response of Inactive Ovaries in Dairy Cattle after Prid Treatment. *Journal of Reproduction and Development*, vol. 46, nº 6, pp.415-422

ANEXOS

Análise estatística tabela 4.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
GC2OSY * ENG	73	93,6%	5	6,4%	78	100,0%

Tabulação cruzada GC2OSY * ENG

			ENG		Total
			Nºao	sim	
GC2OSY GC	Contagem	Contagem	16	23	39
		Contagem Esperada	20,3	18,7	39,0
		% em GC2OSY	41,0%	59,0%	100,0%
		% em ENG	42,1%	65,7%	53,4%
	3,00	Contagem	22	12	34
		Contagem Esperada	17,7	16,3	34,0
		% em GC2OSY	64,7%	35,3%	100,0%
		% em ENG	57,9%	34,3%	46,6%
Total	Contagem	Contagem	38	35	73
		Contagem Esperada	38,0	35,0	73,0
		% em GC2OSY	52,1%	47,9%	100,0%
		% em ENG	100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	4,081 ^a	1	,043	,061	,037
Correção de continuidade ^b	3,188	1	,074		
Razão de verossimilhança	4,125	1	,042		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	4,025	1	,045		
Nº de Casos Válidos	73				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 16.30.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 4.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
gcpq * Engravidou	78	100,0%	0	0,0%	78	100,0%

Tabulação cruzada gcpq * Engravidou

			Engavidou		Total
			Não	Sim	
gcpq	gc	Contagem	16	23	39
		Contagem Esperada	18,5	20,5	39,0
		% em gcpq	41,0%	59,0%	100,0%
		% em Engravidou	43,2%	56,1%	50,0%
	pg	Contagem	21	18	39
		Contagem Esperada	18,5	20,5	39,0
		% em gcpq	53,8%	46,2%	100,0%
		% em Engravidou	56,8%	43,9%	50,0%
Total	Contagem		37	41	78
	Contagem Esperada		37,0	41,0	78,0
	% em gcpq		47,4%	52,6%	100,0%
	% em Engravidou		100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	1,285 ^a	1	,257	,365	,182
Correção de continuidade ^b	,823	1	,364		
Razão de verossimilhança	1,289	1	,256		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	1,269	1	,260		
Nº de Casos Válidos	78				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 18.50.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 4.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
PG2OSy * ENGTRES	73	93,6%	5	6,4%	78	100,0%

Tabulação cruzada PG2OSy * ENGTRES

			ENGTRES		Total
			Não	Sim	
PG2OSy	PG	Contagem	21	18	39
		Contagem Esperada	23,0	16,0	39,0
		% em PG2OSy	53,8%	46,2%	100,0%
		% em ENGTRES	48,8%	60,0%	53,4%
2OSy		Contagem	22	12	34
		Contagem Esperada	20,0	14,0	34,0
		% em PG2OSy	64,7%	35,3%	100,0%
		% em ENGTRES	51,2%	40,0%	46,6%
Total		Contagem	43	30	73
		Contagem Esperada	43,0	30,0	73,0
		% em PG2OSy	58,9%	41,1%	100,0%
		% em ENGTRES	100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,885 ^a	1	,347	,475	,242
Correção de continuidade ^b	,493	1	,483		
Razão de verossimilhança	,889	1	,346		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	,873	1	,350		
Nº de Casos Válidos	73				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 13.97.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 5.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
cessy * EngQuatro	41	52,6%	37	47,4%	78	100,0%

Tabulação cruzada cessy * EngQuatro

			EngQuatro		Total
			Não	Sim	
cessy	CE	Contagem	3	4	7
		Contagem Esperada	2,9	4,1	7,0
		% em cessy	42,9%	57,1%	100,0%
		% em EngQuatro	17,6%	16,7%	17,1%
SSy		Contagem	14	20	34
		Contagem Esperada	14,1	19,9	34,0
		% em cessy	41,2%	58,8%	100,0%
		% em EngQuatro	82,4%	83,3%	82,9%
Total		Contagem	17	24	41
		Contagem Esperada	17,0	24,0	41,0
		% em cessy	41,5%	58,5%	100,0%
		% em EngQuatro	100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,007 ^a	1	,934	1,000	,626
Correção de continuidade ^b	,000	1	1,000		
Razão de verossimilhança	,007	1	,935		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	,007	1	,935		
Nº de Casos Válidos	41				

a. 2 células (50.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2.90.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 6.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
gcpgnov * EngCinco	81	100,0%	0	0,0%	81	100,0%

Tabulação cruzada gcpgnov * EngCinco

			EngCinco		Total
			Não	Sim	
gcpgnov	GC	Contagem	17	25	42
		Contagem Esperada	18,7	23,3	42,0
		% em gcpgnov	40,5%	59,5%	100,0%
		% em EngCinco	47,2%	55,6%	51,9%
	PG	Contagem	19	20	39
		Contagem Esperada	17,3	21,7	39,0
		% em gcpgnov	48,7%	51,3%	100,0%
		% em EngCinco	52,8%	44,4%	48,1%
Total	Contagem	36	45	81	
	Contagem Esperada	36,0	45,0	81,0	
	% em gcpgnov	44,4%	55,6%	100,0%	
	% em EngCinco	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,556 ^a	1	,456	,507	,301
Correção de continuidade ^b	,273	1	,602		
Razão de verossimilhança	,557	1	,456		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	,549	1	,459		
Nº de Casos Válidos	81				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 17.33.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 7.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
CESSynov * EngSeis	24	29,6%	57	70,4%	81	100,0%

Tabulação cruzada CESSynov * EngSeis

			EngSeis		Total
			Não	Sim	
CESSynov	CE	Contagem	2	9	11
		Contagem Esperada	3,2	7,8	11,0
		% em CESSynov	18,2%	81,8%	100,0%
		% em EngSeis	28,6%	52,9%	45,8%
	SSY	Contagem	5	8	13
		Contagem Esperada	3,8	9,2	13,0
		% em CESSynov	38,5%	61,5%	100,0%
		% em EngSeis	71,4%	47,1%	54,2%
Total		Contagem	7	17	24
		Contagem Esperada	7,0	17,0	24,0
		% em CESSynov	29,2%	70,8%	100,0%
		% em EngSeis	100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	1,186 ^a	1	,276	,386	,264
Correção de continuidade ^b	,408	1	,523		
Razão de verossimilhança	1,220	1	,269		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	1,137	1	,286		
Nº de Casos Válidos	24				

a. 2 células (50.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 3.21.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 8.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
SNSSS1 * EngSete	81	100,0%	0	0,0%	81	100,0%

Tabulação cruzada SNSSS1 * EngSete

			EngSete		Total
			Não	Sim	
SNSSS1	SNS	Contagem	13	24	37
		Contagem Esperada	16,4	20,6	37,0
		% em SNSSS1	35,1%	64,9%	100,0%
		% em EngSete	36,1%	53,3%	45,7%
	SS	Contagem	23	21	44
		Contagem Esperada	19,6	24,4	44,0
		% em SNSSS1	52,3%	47,7%	100,0%
		% em EngSete	63,9%	46,7%	54,3%
Total	Contagem	36	45	81	
	Contagem Esperada	36,0	45,0	81,0	
	% em SNSSS1	44,4%	55,6%	100,0%	
	% em EngSete	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,391 ^a	1	,122	,178	,093
Correção de continuidade ^b	1,747	1	,186		
Razão de verossimilhança	2,409	1	,121		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	2,361	1	,124		
Nº de Casos Válidos	81				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 16.44.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 9.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
SNSSS2 * EngOito	24	29,6%	57	70,4%	81	100,0%

Tabulação cruzada SNSSS2 * EngOito

			EngOito		Total
			Não	Sim	
SNSSS2	SNS	Contagem	4	4	8
		Contagem Esperada	2,3	5,7	8,0
		% em SNSSS2	50,0%	50,0%	100,0%
		% em EngOito	57,1%	23,5%	33,3%
	SS	Contagem	3	13	16
		Contagem Esperada	4,7	11,3	16,0
		% em SNSSS2	18,8%	81,3%	100,0%
		% em EngOito	42,9%	76,5%	66,7%
Total	Contagem		7	17	24
	Contagem Esperada		7,0	17,0	24,0
	% em SNSSS2		29,2%	70,8%	100,0%
	% em EngOito		100,0%	100,0%	100,0%

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,521 ^a	1	,112	,167	,134
Correção de continuidade ^b	1,235	1	,266		
Razão de verossimilhança	2,442	1	,118		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	2,416	1	,120		
Nº de Casos Válidos	24				

a. 2 células (50.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2.33.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 10.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
sns.gcpq * Eng.Nove	37	45,7%	44	54,3%	81	100,0%

Tabulação cruzada sns.gcpq * Eng.Nove

			Eng.Nove		Total
			Não	Sim	
sns.gcpq	GC	Contagem	8	17	25
		Contagem Esperada	8,8	16,2	25,0
		% em sns.gcpq	32,0%	68,0%	100,0%
		% em Eng.Nove	61,5%	70,8%	67,6%
	PG	Contagem	5	7	12
		Contagem Esperada	4,2	7,8	12,0
		% em sns.gcpq	41,7%	58,3%	100,0%
		% em Eng.Nove	38,5%	29,2%	32,4%
Total	Contagem	13	24	37	
	Contagem Esperada	13,0	24,0	37,0	
	% em sns.gcpq	35,1%	64,9%	100,0%	
	% em Eng.Nove	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,332 ^a	1	,564	,716	,413
Correção de continuidade ^b	,044	1	,835		
Razão de verossimilhança	,329	1	,567		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	,323	1	,570		
Nº de Casos Válidos	37				

a. 1 células (25.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 4.22.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 10.

Resumo de processamento de casos

	Casos					
	Válidos		Omissos		Total	
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N	Porcentagem
ss.gcpq * Eng.Dez	44	54,3%	37	45,7%	81	100,0%

Tabulação cruzada ss.gcpq * Eng.Dez

			Eng.Dez		Total
			Não	Sim	
ss.gcpq	GC	Contagem	9	8	17
		Contagem Esperada	8,9	8,1	17,0
		% em ss.gcpq	52,9%	47,1%	100,0%
		% em Eng.Dez	39,1%	38,1%	38,6%
	PG	Contagem	14	13	27
		Contagem Esperada	14,1	12,9	27,0
		% em ss.gcpq	51,9%	48,1%	100,0%
		% em Eng.Dez	60,9%	61,9%	61,4%
Total	Contagem	23	21	44	
	Contagem Esperada	23,0	21,0	44,0	
	% em ss.gcpq	52,3%	47,7%	100,0%	
	% em Eng.Dez	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,005 ^a	1	,944	1,000	,595
Correção de continuidade ^b	,000	1	1,000		
Razão de verossimilhança	,005	1	,944		
Teste Exato de Fisher					
Associação Linear por Linear	,005	1	,944		
Nº de Casos Válidos	44				

a. 0 células (.0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 8.11.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Análise estatística tabela 4 (IP-1ªIA)

Descritivas

IP1IA

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
GC	39	109,8205	35,89156	5,74725	98,1858	121,4552	62,00	228,00
PG	39	95,9744	24,90771	3,98843	87,9002	104,0485	62,00	176,00
2OSy	34	96,4412	20,71771	3,55306	89,2124	103,6699	68,00	149,00
Total	112	100,9375	28,69796	2,71170	95,5641	106,3109	62,00	228,00

Teste de Homogeneidade de Variâncias

IP1IA

Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,925	2	109	,058

ANOVA

IP1IA

	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	4725,462	2	2362,731	2,971	,055
Nos grupos	86691,100	109	795,331		
Total	91416,563	111			

Pressupostos:

1. Teste de Levene:

Dada a significância, (0.055), não se rejeita que as amostras sejam retiradas de populações com igual variância. Ou seja, podemos aplicar um teste ANOVA.

2. Normalidade da População:

Pelo teorema do limite central ($n > 30$) podemos assumir a normalidade da população. Ou seja, podemos aplicar um teste ANOVA.

Anova:

H0: O IP-1ºIA é igual para os três protocolos

H1: O IP-1ºIA é diferente em pelo menos um dos protocolos

Resultado:

Não Rejeita a Hipótese Nula. Ou seja não se rejeita que o IP médio seja igual para os três protocolos.